

Aus dem Institut für Nutztierwissenschaften und Technologie der Agrar– und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

**Intestinale Hefen,
deren Stoffwechselaktivität und
Interaktion mit ausgewählten Bakteriengruppen
bei Absetzferkeln**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

doctor agriculturae (Dr. agr.)

an der Agrar– und Umweltwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Dipl.–Ing. agr. Vladimir Urubschurov

geboren am 31.05.1978

aus Bad Doberan

Rostock, Juli 2010

urn:nbn:de:gbv:28-diss2011-0123-4

- Erster Gutachter: Prof. Dr. agr. habil. Annette Zeyner, Institut für Nutztierwissenschaften und Technologie der Agrar– und Umweltwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock
- Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hauke Smidt, Laboratory of Microbiology Wageningen University
- Dritter Gutachter: PD. Dr. rer. nat. et Ing. habil. Elke Boschke, Technische Universität Dresden Institut für Lebensmittel– und Bioverfahrenstechnik
- Vierter Gutachter: Dr. agr. habil. Wolfgang–Bernard Souffrant, Forschungsbereich Ernährungsphysiologie, „Oskar Kellner“ Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN), Dummerstorf

Verteidigt am 24.06.2011

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	VI
Tabellen im Anhang	VI
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Diversität und Entwicklung der intestinalen bakteriellen Mikrobiota.....	3
2.1.1. Postnatale Erstbesiedlung.....	4
2.1.2. Besiedlung und Veränderungen während des Absetzens	7
2.1.3. Besiedlung im adulten Tier	10
2.2. Interaktionen zwischen intestinaler Mikrobiota und Wirt.....	13
2.3. Vorkommen und Wirkung von Hefen im Gastrointestinaltrakt von Menschen und Tieren	15
2.4. Vorkommen von Hefen im Gastrointestinaltrakt des Schweines	16
2.5. Gezielter Einsatz von Hefen in der Ernährung von Mensch und Tier	17
2.6. Methoden zur Untersuchung der Hefen.....	19
2.6.1. Identifizierung und Bestimmung der Biodiversität.....	20
2.6.2. Quantifizierung	23
3. Resümee der Literaturübersicht und abgeleitete Zielstellung für die eigenen Untersuchungen	25
4. Eigene Untersuchungen: Tiere, Material und Methoden	27
4.1. Experiment A – Biodiversität und Charakterisierung der Hefepopulation im Darm von Absetzferkeln.....	27
4.1.1. Versuchstiere, Fütterung und Haltung	27
4.1.2. Schlachtung, Probennahme und –aufarbeitung	29
4.1.3. Kultivierungsabhängige Mikrobiologie	30
4.1.3.1. Keimzahlbestimmung der Hefen im Chymus.....	30
4.1.3.2. Isolierung und Gewinnung der Reinkulturen von Hefen	31
4.1.3.3. Konservierung von Hefekulturen	31
4.1.3.4. ID 32 C System	32
4.1.3.5. API ZYM Test	32
4.1.3.6. Assimilationstest in Mikrotiterplatten.....	33
4.1.3.6.1. Durchführung des Assimilationstestes.....	33

4.1.3.6.2.	Inkubation, Messung der optischen Dichte	34
4.1.3.7.	Fermentationstest.....	35
4.1.4.	Molekulare Mikrobiologie	37
4.1.4.1.	Isolierung genomischer DNA aus Reinkulturen	37
4.1.4.2.	Polymerase–Kettenreaktion der eukaryotischen 26S rDNA	37
4.1.4.3.	Gelelektrophoretische Analyse der PCR–Amplikons.....	38
4.1.4.4.	Sequenzierung der PCR–Amplikons	39
4.1.4.5.	Alignment der Sequenzen	40
4.1.5.	Phylogenetische Analyse der Sequenzen	40
4.1.6.	Statistische Auswertung	41
4.1.7.	Morphologische Ausprägung definierter Hefekulturen.....	43
4.2.	Experiment B – Veränderung der Hefepopulation im Kot von Ferkeln vor und nach dem Absetzen	44
4.2.1.	Versuchstiere, Fütterung und Haltung	44
4.2.2.	Probennahme und – aufarbeitung	44
4.2.3.	Keimzahlbestimmung der Mikroorganismen im Kot.....	45
4.2.4.	Statistische Auswertung	46
4.2.5.	Isolierung und Messung genomischer DNA aus dem Kot	46
4.2.6.	Bestimmung der Hefepopulation mittels der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)	46
4.2.6.1.	PCR des eukaryotischen 26S rRNA Gens	46
4.2.6.2.	Vorbereitung der DGGE–Apparatur und Herstellung des Polyacrylamid–Gels	48
4.2.6.3.	Beladung des Gels und Durchführung der Elektrophorese	50
4.2.6.4.	Färbung und photographische Aufnahme der Gele.....	50
5.	Ergebnisse	51
5.1.	Experiment A	51
5.1.1.	Identifizierung der Hefen	51
5.1.2.	Phylogenetische Analyse	53
5.1.3.	Morphologische Ausprägung	56
5.1.4.	Kultivierungsabhängige Mikrobiologie	57
5.1.4.1.	Keimzahlbestimmung der Hefen im Chymus.....	58
5.1.4.2.	ID 32 C System	59
5.1.4.3.	API ZYM	60

Inhaltsverzeichnis

5.1.4.4.	Assimilationstest in Mikrotiterplatten.....	61
5.1.4.5.	Fermentationstest.....	63
5.1.5.	Analyse der Biodiversität der intestinalen Hefepopulationen.....	64
5.2.	Experiment B.....	67
5.2.1.	Keimzahlbestimmung der Mikroorganismen im Kot.....	67
5.2.2.	Identifizierung der Chloramphenicol-resistenten Bakterien	69
5.2.3.	DGGE.....	70
6.	Diskussion	73
6.1.	Beschreibung der Hefevielfalt im GIT von Ferkeln	73
6.2.	Statistische Bewertung der Hefevielfalt im GIT der Ferkel	75
6.3.	Phylogenetische Analyse der Hefe-DNA-Sequenzen.....	76
6.4.	Keimzahlbestimmung auf der Basis der Kultivierung.....	77
6.5.	DGGE-Analyse	81
6.6.	Kultivierungsabhängige Charakterisierung der Hefen	83
6.6.1.	Assimilations- und Fermentationstests	83
6.6.2.	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von <i>Kazachstania slooffiae</i>	84
7.	Schlussfolgerungen.....	87
8.	Zusammenfassung	89
9.	Literaturverzeichnis	93
Anhang.....		114
Danksagung.....		120

Abkürzungsverzeichnis

ABF	abgesetzte Ferkel
ALF	Antibiotika als Leistungsförderer
ANOVA	Analysis of Variance
API	Analytical Profile Index
bp	Basenpaare
CArBakt	Chloramphenicol-resistente Bakterien
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Niederlande
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
EAS	Experimentalanlage Schwein
EDTA	Ethylen–Diamin–Tetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FFS	flüchtige Fettsäuren
FISH	Fluoreszenz–in–situ–Hybridisierung
GIT	gastrointestinaler Trakt
HS	Hefesuspension
Kb	Kilobasen (1000 bp)
KBE	koloniebildende Einheiten
KF	kommerzielle Farm
LT	Lebenstag
NAF	nicht abgesetzte Ferkel
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase–Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RTQ–PCR	Real–Time quantitative PCR
SGA	Sabouraud–Glucose–Agar
spp.	Spezies (Plural)
TAE	Tris–Acetat–EDTA–Puffer
TGGE	Temperatur Gradienten Gelelektrophorese

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Datenbestand von mehr als 20.000 16S rDNA Sequenzen isoliert aus Faecesproben von Säugetieren (Ley <i>et al.</i> , 2008).	12
Tab. 2:	Zusammensetzung des Ferkelaufzuchtfutters I (Experiment A)	29
Tab. 3:	Primer für PCR in Experiment A	37
Tab. 4:	PCR-Programm in Experiment A	38
Tab. 5:	Primer für PCR in Experiment B	47
Tab. 6:	PCR-Programme in Experiment B	48
Tab. 7:	Zusammensetzung der denaturierenden Gradienten	49
Tab. 8:	Aus dem Gastrointestinaltrakt von abgesetzten (ABF) und nicht abgesetzten (NAF) Ferkeln (39 LT.) isolierte Hefephylotypen	52
Tab. 9:	Hefekeimzahl (lg KBE/g Chymus), isoliert aus dem terminalen (1/3) Ileum, Caecum und Colon von abgesetzten (ABF) und nicht abgesetzten (NAF) Ferkeln (39 LT.)	58
Tab. 10:	Ergebnisse des ID 32C Systemes von <i>C. catenulata</i> und <i>G. geotrichum</i>	59
Tab. 11:	Ergebnisse des Assimilationstestes in Mikrotiterplatten basierend auf der visuellen Beurteilung	62
Tab. 12:	Ergebnisse des Fermentationstestes	63
Tab. 13:	Simpson und Shannon Indizes der intestinalen Hefepopulation	65
Tab. 14:	Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota (lg KBE/g Kot; Mittelwerte + S), isoliert aus dem Kot von abgesetzten (ABF) und nicht abgesetzten Ferkeln (NAF) der Experimentalanlage Schwein (EAS, n = 16 je Gruppe) und der kommerziellen Farm (KF, n = 16 je Gruppe).	67

Tabellen im Anhang

Tab. A 1:	Zusammensetzung der vitaminisierten Mineralstoffmischung im Experiment A (0,4 % je kg Futter)	114
Tab. A 2:	Interpretation der McFarland Standardreihen	115
Tab. A 3:	Zusammensetzung des API ID 32C Streifens	115
Tab. A 4:	Zusammensetzung des API ZYM Streifens	116

Tabellenverzeichnis

Tab. A 5:	Für die phylogenetische Analyse verwendete Accessionsnummern der NCBI Gendatenbank von eigenen und Referenzsequenzen	117
Tab. A 6:	Anordnung der im Assimilationstest verwendeten Substrate auf der Mikrotiterplatte.	118
Tab. A 7:	Stammlösungen für DGGE	119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Veränderungen im GIT von Ferkeln nach dem Absetzen.....	8
Abb. 2:	Konzentrationen verschiedener bakterieller Gruppen im Dünndarmchymus von Absetzferkeln nach Pieper <i>et al.</i> (2008).....	9
Abb. 3:	Schematische Darstellung von amplifizierenden Regionen: 18S, 5,8S rDNA sowie der D1 & D2 Domäne der 26S rDNA und ITS 1 & ITS 2 (internal transcribed spacer) nach Pincus (2007).....	20
Abb. 4:	Prozessbeschreibung zur Durchführung der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) und eine mögliche Auswertung der Ergebnisse	22
Abb. 5:	Abferkelbuchten der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF).	28
Abb. 6:	Gelelektrophoresekammer Agal Midi–Wide (a) und Geldokumentationssystem AlphaDigiDoc RT (b).....	39
Abb. 7:	Gradientenmischer (a), Econo Gradientenpumpe (b), Gel–Kassette mit einem Kamm (c) und das DCode Universal Mutation System (d).....	49
Abb. 8:	Gewurzelter phylogenetischer Neighbor–Joining–Baum der Sequenzen der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA von aus dem Gastrointestinaltrakt der Ferkel isolierten Hefen und der Referenzsequenzen aus der NCBI Gen-datenbank	54
Abb. 9:	Neighbor–Joining phylogenetischer Baum der <i>Kazachstania</i> <i>slooffiae</i> Sequenzen der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA.....	55
Abb. 10:	Hefekolonien, die aus dem Ferkeldarm isoliert und 4 Tage bei 37 °C auf SGA–Platten inkubiert wurden.....	57
Abb. 11:	Enzyymbildungsvermögen der <i>Kazachstania slooffiae</i> –Stämmen im API ZYM Streifen nach 4,5 Stunden Inkubation bei 37 °C.....	61
Abb. 12:	Kumulative Hefespezies–Kurven von Q–Statistik. Die Biodiversität der kultivierten Hefen im Darm der Ferkel aus der Experimental- anlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF), ermittelt durch die Berechnung des Abstandes zwischen den 25 %– (R ₁) und 75 % – Quantilen (R ₂).	64

Abb. 13:	Keimzahl (lg KBE/g) der Hefen und Bakterien isoliert aus Sauenkot (n = 4, je Anlage) der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF).	69
Abb. 14:	DGGE–Profile der 26S rDNA PCR–Produkte von auf SGA Medium kultivierten und mittels Sequenzierung identifizierten Hefen.....	71
Abb. 15:	DGGE–Profile der 26S rDNA PCR–Produkte von Hefen aus dem Kot von abgesetzten Ferkeln (33. und 39. LT) der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF)	72

1. Einleitung

Der Gastrointestinaltrakt der Schweine repräsentiert ein komplexes Mikroökosystem, das von verschiedenen Mikroorganismen besiedelt wird, die eine wichtige Rolle für die Gesundheit des Wirtstieres spielen. Die Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota, vor allem der Abbau der für den Wirtsorganismus unverdaulichen, schwerlöslichen Kohlenhydrate zu organischen Fettsäuren, beeinflusst nicht nur den gesamten Energieumsatz, sondern hat auch positive Effekte auf die Darmschleimhaut (z. B. Zellproliferation) und eine stimulierende Wirkung auf das Immunsystem. Da der Wirt den Mikroorganismen die dazu notwendigen Lebensbedingungen gibt, können somit die Interaktionen zwischen dem Wirt und den im Darm vorkommenden Keimen unter physiologischen Bedingungen als symbiotisch bezeichnet werden.

Während des Lebens der Tiere verändert sich die Zusammensetzung der mikrobiellen intestinalen Besiedlung. Bis zur Ausbildung einer stabilen mikrobiellen Besiedlung des Verdauungstraktes sind die Jungtiere besonders anfällig gegenüber Krankheiten. Das Absetzen von Ferkeln gilt als eine der kritischsten Phasen in der Schweinehaltung und ist oft mit Stress, hoher Durchfallinzidenz und den daraus folgenden Wachstumsstörungen assoziiert. Aus diesem Grund wächst das wissenschaftliche Interesse an der Entwicklung von Zusätzen zum Futter wie Probiotika, Präbiotika oder organischen Säuren, die die autochthone (indigene) intestinale Mikrobiota des Wirtstieres günstig modifizieren können.

Die intestinale Mikrobiota bei Schweinen ist nur teilweise erforscht. Eine Vielzahl der wissenschaftlichen Untersuchungen beruht auf konventionellen Kultivierungsmethoden mit anschließenden morphologischen und biochemischen Untersuchungen, deren Interpretation jedoch oft schwierig und fehlerhaft ist. Des Weiteren sind solche Untersuchungen sehr zeit- und arbeitsaufwändig. Darüber hinaus werden bei den klassischen Untersuchungen ausschließlich kultivierbare Mikroorganismen detektiert, wobei die nicht kultivierbaren Keime vernachlässigt werden. Anwendungen, wie die in den letzten Jahren entwickelten neuen molekularbiologischen Methoden, liefern in wesentlich kürzerer Zeit präzisere, eindeutige Ergebnisse und erweitern somit die bestehenden Kenntnisse über die den Darm besiedelnden Mikroorganismen. Solche Methoden, wie Real-Time quantitative PCR (RTQ-PCR), Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) und denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE) finden in den letzten Jahren zunehmend Anerkennung als schnelle und effektive

Verfahren zur Untersuchung der mikrobiellen Verhältnisse in diversen ökologischen Nischen. Diese Methoden ermöglichen eine relativ schnelle und insbesondere kultivierungsunabhängige Charakterisierung. Da die erhaltenen Ergebnisse ohne klassische Verfahren jedoch in einigen Fällen einseitig sein können und keine ausführliche Information geben, werden gegenwärtig oft die klassischen und molekularbiologischen Methoden für die Forschung auf dem Gebiet der intestinalen Mikrobiologie in Kombination angewendet.

Der Dünn- und Dickdarm der Schweine wird hauptsächlich von prokaryotischen aber auch von eukaryotischen Mikroorganismen kolonisiert. Während in der Literatur bei der Beurteilung der Darmbesiedlung vorwiegend milchsäurebildende Bakterien berücksichtigt wurden, liegen über die Hefebesiedlung des Darmes von Tieren und deren Wechselwirkungen mit dem Wirt nur sehr wenige Untersuchungen vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Erweiterung des Kenntnisstandes zum einen über die Zusammensetzung und die Biodiversität der Hefepopulation, zum anderen über deren Etablierung im Darm von Ferkeln während der Absetzphase zu leisten. Hierfür wurden klassische, kultivierungsabhängige Methoden (Keimzahlbestimmung, Assimilations- und Fermentationstests) und moderne, molekularbiologische Methoden (DNA-Sequenzierung, Polymerase-Ketten-Reaktion mit anschließender denaturierender Gradientengelelektrophorese) angewendet. Weiterhin soll mit den beschriebenen Untersuchungen geprüft werden, inwieweit unterschiedliche Umgebungs- bzw. Haltungsbedingungen, bei Einsatz des gleichen Futters, einen Einfluss auf die intestinalen Hefen ausüben.

2. Literaturübersicht

2.1. Diversität und Entwicklung der intestinalen bakteriellen Mikrobiota

Der gesamte Gastrointestinaltrakt (GIT) der Säugetiere wird von der mikrobiellen Gemeinschaften mit einer hohen Dichte und Vielfalt kolonisiert, wobei die Bakterien mit einer geschätzten Anzahl von über 500 Spezies dominieren (Hooper *et al.*, 2002; Zoetendal *et al.*, 2006). Diese Mikroorganismen beeinflussen die physiologische Entwicklung des GIT in der postnatalen Phase und die Gesundheit des Wirtes in positiver Weise (Hooper, 2004; Backhed *et al.*, 2005).

Die Gesamtheit der Mikroorganismen und der abiotischen und biotischen Standortfaktoren stellt ein mikrobielles Ökosystem dar. Dies wird in mikrobielle Biotope eingeteilt, welche als räumlich begrenzte Habitate der Mikrobiozönose (Mikrobiota) mit gleichartigen Bedingungen beschrieben werden können. Dabei werden die Mikroorganismen, die den intestinalen Bedingungen am besten angepasst sind, als autochthone bzw. indogene bezeichnet. Die anderen, welche mit der Nahrung und aus der Umwelt in den GIT des Wirtes gelangen, werden als allochthone bzw. transiente oder biotopfremde Keime definiert (Mackie *et al.*, 1999).

Alle Kompartimente des Verdauungstraktes, von der Mundhöhle bis zum Rektum, sind von Mikroorganismen besiedelt. Ferner ist zu bemerken, dass die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota sich innerhalb des GIT quantitativ und qualitativ, vom Magen bis zum Dickdarm zunehmend, unterscheidet (Simpson *et al.*, 1999). Außerdem werden im GIT mindestens vier Mikrohabitate unterschieden, die von Mikroorganismen kolonisiert werden (Freter, 1992; Mackie *et al.*, 1999). Drei davon assoziieren sich mit unterschiedlichen Mukosaschichten: die Oberfläche der epithelialen Zelle, die Mukusschicht auf den Mikrovilli und innerhalb der Lieberkühn-Krypten. Das vierte und am meisten erforschte Mikrohabitat ist das Lumen. Hinsichtlich der bakteriellen Mikrobiota im Lumen existieren zahlreiche Publikationen. Über die Differenzen zwischen der mukosal- und luminal-assoziierten Mikrobiota herrschen abweichende Meinungen. Einige Forscher behaupten, dass die mukosal-assoziierte Mikrobiota eine Subpopulation der luminalen Mikrobiota repräsentiere (Leser *et al.*, 2002) bzw. umgekehrt und daher die beiden Mikrohabitate nicht voneinander zu differenzieren seien (Conway, 1994). Vom Standpunkt der anderen Autoren unterscheiden sich die Mikrohabitate (Pryde *et al.*, 1999; Macfarlane und

Dillon, 2007) in der bakteriellen Zusammensetzung und auf der phylogenetischen Ebene (Eckburg *et al.*, 2005). Eckburg *et al.* (2005) postulieren, dass die fäkale Mikrobiota eine Kombination der mukosalen Bakterien mit nicht adhärenen luminalen Populationen repräsentiert.

Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota, von einem simplen zu einem dynamischen, stabilen Mikroökosystem, ist ein komplexer Prozess, der von einer Reihe Faktoren (z. B. Umweltbedingungen, Wirt und Diäten) beeinflusst wird (Konstantinov *et al.*, 2006; Bauer *et al.*, 2006a).

2.1.1. Postnatale Erstbesiedlung

In der pränatalen Phase ist der Gastrointestinaltrakt vom Fötus steril. Unter der Geburt sowie wenige Stunden danach wird der Gastrointestinaltrakt der Neugeborenen zum ersten Mal mit Mikroorganismen besiedelt, die von der mütterlichen vaginalen, fäkalen und dermalen Flora sowie aus der Umgebung stammen (Mackie *et al.*, 1999; Thompson *et al.*, 2008). Innerhalb weniger Stunden kolonisieren die aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien (z. B. *Enterobacterium* spp. *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp.) den Darm (Bauer *et al.*, 2006b; Palmer *et al.*, 2007). Bereits 12 Stunden nach der Geburt kann die Dichte der bakteriellen Population im Colon $10^9 - 10^{10}$ KBE/g Chymus erreichen (Swords *et al.*, 1993). Aus dieser rasanten Besiedlung resultiert ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs und das entstehende anaerobe Milieu sowie das negative Redoxpotential fördert das Wachstum der obligat anaeroben Bakterienarten wie z. B. *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium* (Swords *et al.*, 1993; Mackie *et al.*, 1999). Der Prozess der mikrobiellen Entwicklung ist individuell verschieden und wird von den bereits oben genannten Faktoren beeinflusst.

Einfluss der mütterlichen Mikrobiota

Bei Mensch und Tier wird vorwiegend die Mikrobiota der Mutter als Hauptquelle der ersten Besiedlung genannt (Conway, 1994; Penders *et al.*, 2006). Unter der Geburt wird der GIT des Fötus von der vaginalen und fäkalen Mikrobiota kolonisiert. Es wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der maternalen Mikrobiota und der Mikrobiota der Neugeborenen nachgewiesen (Mandar und Mikelsaar, 1996). Bei Untersuchungen an Menschen konnten Biasucci *et al.* (2008) und Penders *et al.*

(2006) beobachten, dass sich die intestinale Mikrobiota der vaginal geborenen Säuglinge im Gegensatz zu denen, die per Kaiserschnitt entbunden wurden, unterscheidet, womit der Einfluss der mütterlichen Mikrobiota unterstrichen wird. Eine mögliche Beeinflussung des intestinalen Mikroökosystems bei Ferkeln ist der Verzehr des Sauenkotes (Koprophagie). Die oral mit bis zu 85 g Kot pro Tag (Sansom und Gleed, 1981; Gleed und Sansom, 1982) aufgenommenen Mikroorganismen etablieren sich im GIT der Ferkel. Eine Bestätigung dieser Aussage lieferten Katouli *et al.* (1997), die durch den Vergleich des metabolischen Fingerprints des Sauen- mit Ferkelkotes festgestellt haben, dass die Darmmikrobiota der Ferkel in den ersten Lebenstagen eine hohe Übereinstimmung mit der Darmmikrobiota der Muttersau aufweist. Nach einer mehrmaligen Übertragung von Human-Faeces an gnotobiotische (keimfreie) Ferkel untersuchten Pang *et al.* (2007) die fäkale Mikrobiota mittels molekularbiologischer Methoden wie RTQ-PCR und Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR sowie TGGE. Der Studie zufolge wiesen die Ferkel eine der Donator-Mikrobiota sehr ähnliche Zusammensetzung auf, die nur minimale individuelle Unterschiede auswies. Die intestinale Mikrobiota der jungen Ferkel ist allerdings sehr dynamisch. Bereits nach der ersten Lebenswoche entwickelt sich eine individuelle Darmmikrobiota, die sich von der maternalen Mikrobiota unterscheidet (Katouli *et al.*, 1997).

Wirts- und Umweltfaktor

Der Wirtsfaktor hängt mit physiologischen Faktoren wie der Entwicklung des GIT, der Peristaltik, den Gallensäuren, dem Redoxpotential, dem intestinalen pH-Wert, der Immunreaktion sowie den mikrobiellen Interaktionen, den Mukosarezeptoren und der Medikamentversorgung zusammen (Fanaro *et al.*, 2003). In den letzten Jahren wurde auch untersucht, inwieweit möglicherweise der Genotyp des Wirts eine Rolle bei der intestinalen Besiedlung spielt (Zoetendal *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 2005). Zoetendal *et al.* (2001) haben herausgefunden, dass die fäkalen 16S rDNA DGGE-Profile eineiiger Zwillinge signifikant ähnlicher als die Profile von nicht verwandten Individuen oder von Ehepartnern waren. Stewart *et al.* (2005) haben die eubakteriellen TGGE-Profile der Faeces von eineiigen – (EZ), zweieiigen Zwillingen (ZZ) sowie nicht verwandten Kindern (NVK) im Alter von durchschnittlich 23 Monaten anhand des Sørensen-Index miteinander verglichen. Die Profile von Zwillingen ähnelten sich, wobei die höchste Ähnlichkeit (EZ – 82 %; ZZ – 68 %; NVK – 45 %) bei den

eineiigen Zwillingen nachgewiesen wurde. Basierend auf den Ergebnissen schlossen die Autoren, dass der Genotyp des Wirtes eine Wirkung auf die Darmmikrobiota ausüben kann. Da davon auszugehen ist, dass die untersuchten verwandten Individuen unter gleichen Umweltbedingungen aufgewachsen sind, ist schwer einzuschätzen, was die primäre Ursache für die ähnliche Zusammensetzung der Mikrobiota ist – der Verwandtschaftsgrad oder die Umweltbedingungen. Wie bereits erwähnt, beeinflussen die Umweltbedingungen die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota in starkem Maße.

Laut Thompson *et al.* hat bei Ferkeln die Umwelt bereits kurze Zeit nach der Geburt einen starken Einfluss auf die Entwicklung der Darmmikrobiota (Thompson *et al.*, 2008; Thompson und Holmes, 2009). Auch Janczyk *et al.* (2009) und Urubschurov *et al.* (2008) konnten in ihren Untersuchungen unter Nutzung der klassischen Kultivierung sowie molekularer Methoden eindeutige Unterschiede in den mikrobiellen Populationen im Kot von Ferkeln feststellen, die unter unterschiedlichen hygienischen Bedingungen gehalten wurden. Ebenso wurden in mehreren Studien an Menschen die Umgebung sowie die hygienischen Verhältnisse als wichtige Faktoren in der Entwicklung der intestinalen Mikrobiota der Säuglinge genannt (Freter, 1992; Fanaro *et al.*, 2003).

Milchdiät in der Säugezeit

Die Säugezeit beginnt mit der Kolostrumaufnahme und endet mit dem Absetzen der Ferkel. Das Sauenkolostrum und die Sauenmilch beinhalten nicht nur hochverdauliche Nährstoffe sondern auch Wachstumsfaktoren und verschiedene bioaktive Komponenten wie z. B. Lysozym und Antikörper, die die Entwicklung des Immunsystems stimulieren (Playford *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000; Stokes *et al.*, 2004). Da die Plazenta der Sau in der Embrionalperiode für Antikörper nicht durchlässig ist, werden die Immunglobuline erst nach der Geburt mit dem Kolostrum aufgenommen (Bauer *et al.*, 2006b). Deshalb ist bei Ferkeln die Kolostrumaufnahme in den ersten 48 Stunden besonders wichtig. Die antimikrobiellen Peptide z. B. Lactoferrin, Lactoperoxidase und Transferrin sind ebenso in der Milch enthalten und inhibieren das Wachstum vieler pathogener Bakterien wie z. B. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. und *Streptococcus* spp. (Playford *et al.*, 2000; Stokes *et al.*, 2004; Valenti und Antonini, 2005).

Eine Vielzahl sowohl pathogener als auch apathogener *E. coli* Spezies, (Katouli *et al.*, 1995) sowie *Lactobacillus* spp. und *Clostridium* spp. werden zu den ersten, den Ferkeldarm kolonisierenden, Mikroorganismen gezählt (Swords *et al.*, 1993). *Lactobacillus* spp. dominieren dabei im Verlauf der Säugezeit und des Absetzens. (Bateup *et al.*, 1998; Bauer *et al.*, 2006b). Bereits zwei Tage nach der Geburt bis zum Absetzen besteht die gesamte Population im Ileum–Lumen von Ferkeln aus $10^7 - 10^8$ *Lactobacillus*-Zellen. Bei Ferkeln dominierten hierbei *L. sobrius*, *L. reuteri* und *L. acidophilus* (Naito *et al.*, 1995; Konstantinov *et al.*, 2006). Laktobazillen haben einen positiven Effekt auf die Gesundheit der Tiere und zeigen eine antagonistische Wirkung gegen pathogene Bakterien (Servin, 2004). Dagegen sind bei Saugferkeln Clostridien wie z. B. *C. perfringens* und *C. difficile* (Songer und Uzal, 2005) ebenso wie pathogene *E. coli* Stämme (Dean-Nystrom *et al.*, 2000) in dominanten Konzentrationen als Erreger von Darmkrankheiten bekannt.

2.1.2. Besiedlung und Veränderungen während des Absetzens

Das Absetzen der Ferkel im Alter von 21 bis 28 Tage ist in der heutigen intensiven Schweineproduktion gängige Praxis. Im Gegensatz dazu haben Ferkel in der freien Natur bis zu 10 Wochen Zeit, sich an feste Nahrung zu gewöhnen und eine stabile Darmmikrobiota aufzubauen. Im Vergleich dazu erfolgt in industriellen Anlagen eine abrupte Trennung von der Muttersau (Bailey *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2007). Absetzen, Nahrungsumstellung (von hochverdaulicher Milch zum weniger verdaulichen, komplexen festen Futter), Umgebungswechsel und Einstallung mit Ferkeln aus anderen Würfen verursachen Stress und führen auf physiologischer, mikrobiologischer und immunologischer Ebene zu starken Veränderungen (Abb. 1) im GIT des Tieres (Konstantinov *et al.*, 2004; Lallès *et al.*, 2007).

Diese Kombination von Stressfaktoren bedingt in dieser kritischen Lebensphase eine verminderte Futteraufnahme bzw. Appetitlosigkeit (Anorexie), Veränderungen in der Zusammensetzung der physiologischen Darmmikrobiota (Dysbiose) und hohe Durchfallinzidenz (Lallès *et al.*, 2004), die bei Absetzferkeln einen negativen Einfluss auf die Gesundheit und Wachstumsleistung zur Konsequenz haben. Darüber hinaus ist das mukosale Immunsystem bei Ferkeln im Alter von 5 – 6 Wochen noch nicht voll etabliert, sondern befindet sich im Entwicklungsstadium (Bailey *et al.*, 2005).

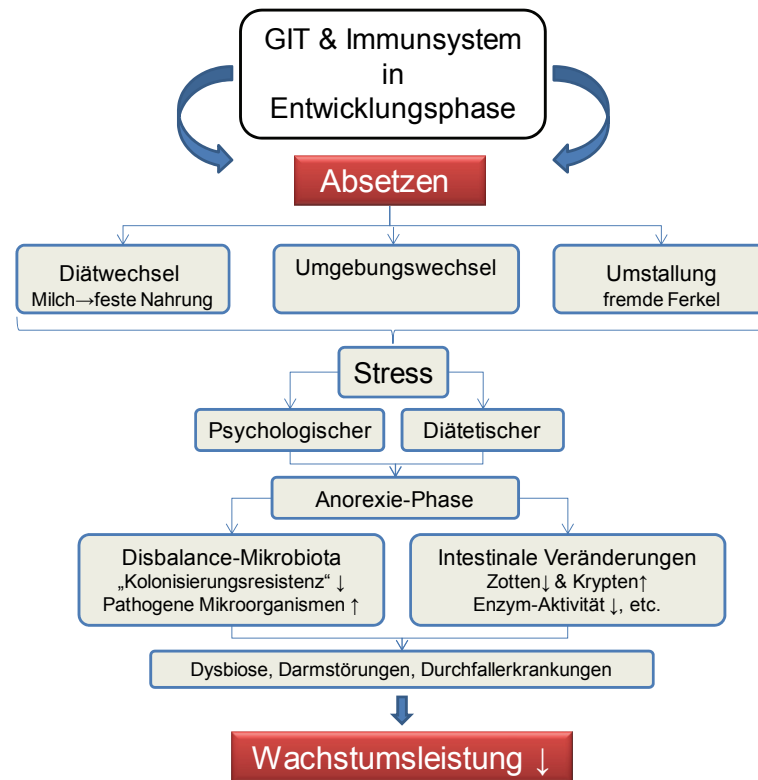


Abb. 1: Veränderungen im GIT von Ferkeln nach dem Absetzen

In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass das Absetzen morphologische und physiologische Veränderungen im Intestinaltrakt - insbesondere im Dünndarm - verursacht, die in Form von verkürzten Zotten (Atrophie) gefolgt von Kryptenhyperplasie, reduzierter Aktivität von Verdauungsenzymen und Störungen der Absorption, Sekretion und Permeabilität zum Ausdruck kommen (Bailey *et al.*, 2001; Boudry *et al.*, 2004; Lallès *et al.*, 2004; Montagne *et al.*, 2007).

Aufgrund der aufgezeigten Problematik wird von zahlreichen Wissenschaftlern besonders diese Zeitperiode intensiv untersucht (Katouli *et al.*, 1995; Lallès *et al.*, 2004; Stokes *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2007; Janczyk *et al.*, 2007; 2008; 2009). Einen Überblick über die Veränderungen der bakteriellen Gruppen, die unter Anwendung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) quantifiziert wurden, ist in Abb. 2 dargestellt. Nach dem Absetzen nimmt die Konzentration der intestinalen Bakterien ab.

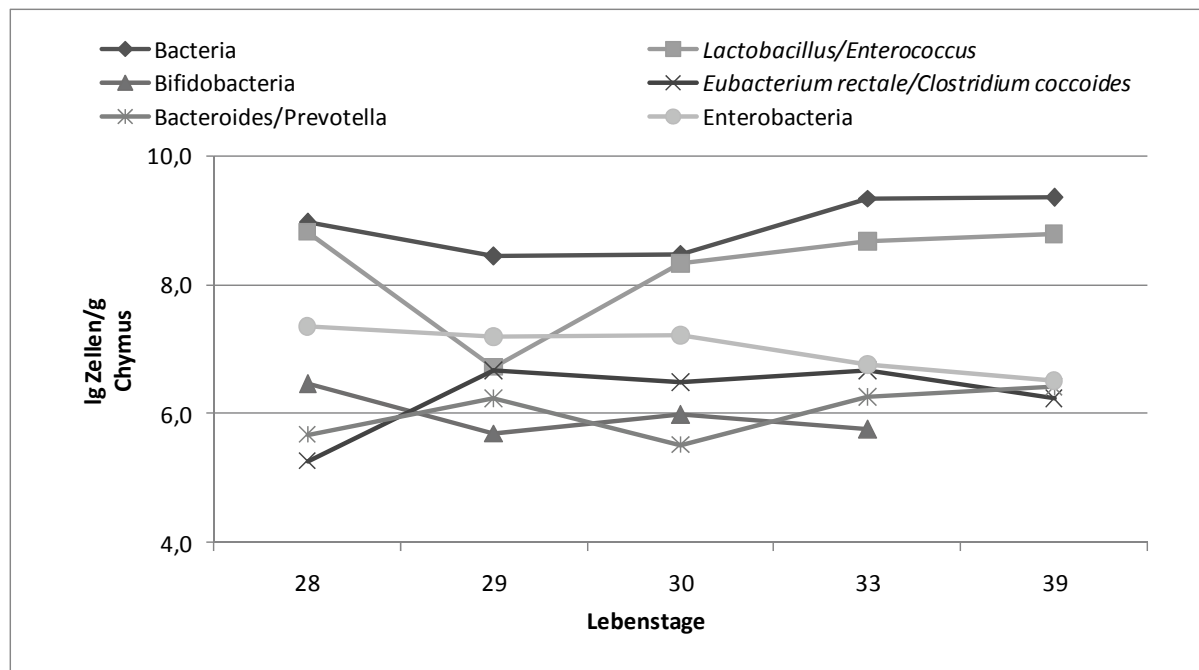


Abb. 2: Konzentrationen verschiedener bakterieller Gruppen im Dünndarmchymus von Absetzferkeln nach Pieper *et al.* (2008).

Die Keimzahlreduzierung innerhalb der intestinalen Mikrobiota zeigt sich auch in einer verminderten Konzentration an mikrobiellen Metaboliten wie z. B. Laktat und flüchtigen Fettsäuren (FFS). *Lactobacillus* spp. sind durch eine starke quantitative Abnahme und Minderung der Diversität gekennzeichnet (Konstantinov *et al.*, 2006; Janczyk *et al.*, 2007; Pieper *et al.*, 2008). Außerdem konnte von Pieper *et al.* (2006) eine verminderte Konzentration (KBE/g Probe) von *Enterococcus* spp. am 5. und 11. Tagen nach dem Absetzen beobachtet werden. Die in der Mikrobiota von Menschen normalerweise vorkommenden Bifidobakterien werden im Ferkeldarm nur gelegentlich und in deutlich niedrigere Anzahl detektiert (Mikkelsen *et al.*, 2003; Loh *et al.*, 2006; Pieper *et al.*, 2008). Ein Wirtsorganismus mit einer stark reduzierten kommensalen Mikrobiota ist durch die daraus resultierende Dominanz potenziell pathogener Bakterien wie *E. coli*, *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp. gesundheitlich stark gefährdet (Wieler *et al.*, 2001; Melin *et al.*, 2004). Dabei kann bei den fakultativ pathogenen Bakterien der Gruppe *Enterobacteriaceae*, insbesondere *E. coli*, die Konzentration im GIT ansteigen ohne Durchfallerkrankungen auszulösen (Pieper *et al.*, 2008). Dies ist durch die Prävalenz von apathogenen autochthonen

Enterobacteriaceae spp., deren Population im GIT von Schweinen vielfältig und dynamisch ist (Katouli *et al.*, 1995; Schierack *et al.*, 2007), erklärbar.

Das Absetzen hat erheblichen Einfluss auf das weitere Leben der Ferkel. Umso wichtiger sind deshalb Erkenntnisse aus wissenschaftlichen Studien, die helfen, Strategien zur Unterstützung der kommensalen Mikrobiota in der kritischen Phase zu erarbeiten. Jahrelang wurden Antibiotika als Futtermittelzusätze in niedriger Dosierung zur Unterdrückung pathogener Bakterien und zur Wachstumsförderung bei Tieren eingesetzt. Ein übermäßiger Einsatz von Antibiotika in Human- und Veterinärmedizin sowie der frühere Einsatz von Fütterungsantibiotika in der Tierernährung wird bei vielen Bakterien als Ursache für die Entwicklung von Resistenzen angesehen (Nathan, 2004). Mit dem im Jahr 2006 gesetzlich festgelegten EU-weiten Verbot einer Anwendung von Antibiotika als Leistungsförderer (ALF) bei allen Tierarten soll einer Resistenzbildung vorgebeugt werden. Aus dieser Sicht ist es von steigendem wissenschaftlichen Interesse, Alternativen zu ALF, wie z. B. Probiotika (Zeyner und Boldt, 2006; Taras *et al.*, 2007; Pieper *et al.*, 2009), Präbiotika und andere Futterzusatzstoffe (Lallès *et al.*, 2007; Metzler *et al.*, 2009) zu entwickeln. Diese Futterzusatzstoffe sollen die Zusammensetzung der indigenen intestinalen Mikrobiota günstig modifizieren und die Invasion bzw. die Dominanz opportunistisch pathogener Mikroorganismen im GIT hemmen oder verhindern.

2.1.3. **Besiedlung im adulten Tier**

Der GIT von gesunden adulten Tieren stellt ein stabiles und komplexes mikrobielles Ökosystem dar, das für jedes Individuum spezifisch ist. Differenzen in der Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota sind das Ergebnis von komplexen Interaktionen zwischen Wirt, Mikroorganismen und Umwelt (Frank und Pace, 2008). Weiterhin weisen die einzelnen Kompartimente des Verdauungstraktes sehr unterschiedliche Milieubedingungen auf, die in einigen physikochemischen Charakteristika sogar recht extrem sein können. Aufgrund von Säurebildung und schneller Chymuspassage erfolgt sowohl im Magen als auch in den proximalen Dünndarmabschnitten (Duodenum, Jejunum) nur eine relativ spärliche Kolonisation durch Bakterien ($10^3 - 10^5$ KBE/g Ingesta). Dabei dominieren die Vertreter der Gattungen: *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. und *Streptococcus* spp. (Jensen, 1998). Die milchsäurebildenden Bakterien sind vor allem durch ihre hohe

Säuretoleranz sowie ihre Fähigkeit zur Adhäsion an der Schleimhautoberfläche in der Lage, den Magen zu besiedeln. Im menschlichen Magen wurden mehr als 100 Phylotypen überwiegend von Phyla - *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Fusobacteria* - mittels 16S rDNA-Sequenzanalyse ermittelt (Bik *et al.*, 2006; Dicksved *et al.*, 2009). Derartige Untersuchungen über die mikrobielle Besiedlung des Schweinemagens sind in der Literatur nicht zu finden.

Entlang des Verdauungstraktes nimmt die Konzentration an Mikroorganismen zu und erreicht im distalen Ileum ca. 10^9 KBE/g Darminhalt (Jensen und Jorgensen, 1994). Im distalen Dünndarmabschnitt verlangsamt sich die Passagerate deutlich. Aufgrund des dadurch bedingten höheren Nährstoffaufkommens sowie des steigenden pH-Werts verändert sich die Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota. Des Weiteren wird in diesem Abschnitt des Verdauungstraktes das Redoxpotenzial zunehmend negativ, wodurch sich die Bedingungen für die Anarobier verbessern. Der terminale Dünndarm von Schweinen wird vor allem durch *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. und *Clostridium* spp. sowie *Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp. und *Bacteroides* spp. besiedelt (Jensen, 2001; Hill *et al.*, 2005; Metzler *et al.*, 2009). Der größte Teil der intestinalen Mikrobiota ist im Colon und Caecum lokalisiert. Der dort enthaltene Darminhalt ist durch eine artenreiche, vielseitige Mikroorganismenpopulation gekennzeichnet und beinhaltet etwa $10^{11} - 10^{12}$ Zellen/ml (Ley *et al.*, 2006). Bei Schweinen findet die mikrobielle Fermentation von Nährstoffen vor Allem im Dickdarm (Caecum und proximales Colon) statt. Die vorherrschenden Milieufaktoren des Dickdarmes - neutraler pH-Wert und langsamer Transport des nährstoffreichen Darminhaltes - bilden optimale Bedingungen für die mikrobielle Besiedlung.

Eine molekulare Analyse fäkaler Proben von Säugetieren ergab 17 Phyla von Bakterien (Tab. 1) (Ley *et al.*, 2008). Frank *et al.* (2007) haben mehr als 45.000 bakterielle rDNA der humanen gastrointestinalen Mikrobiota analysiert. Davon gehörten mehr als 98 % zu vier Phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* und *Actinobacteria*. In metagenomischen Studien konnten die auf klassischer Kultivierung basierenden Kenntnisse zur Zusammensetzung der humanen bakteriellen Dickdarmmikrobiota auf 200 – 300 individuelle Spezies erweitert werden (Eckburg *et al.*, 2005; Frank *et al.*, 2007). Ebenso zeigten molekulare Untersuchungen des Schweinekotes, die auf Sequenzierung des 16S rRNA oder Chaperonin-60 Gens beruhten, dass die Mehrheit der intestinalen Bakterien bis jetzt mit klassischen

Kultivierungsmethoden nicht ermittelt wurde (Leser *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2002). Den Studien zufolge dominieren im Dickdarm der Schweine Bakterien der Gattungen *Eubacterium*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* sowie Spezies vom Phylum *Proteobacteria*.

Tab. 1: Datenbestand von mehr als 20.000 16S rDNA Sequenzen isoliert aus Faecesproben von Säugetieren (Ley *et al.*, 2008)

Phyla	%
<i>Firmicutes</i>	65,70
<i>Bacteroidetes</i>	16,30
<i>Proteobacteria</i>	8,80
<i>Actinobacteria</i>	4,70
<i>Verrucomicrobia</i>	2,20
<i>Fusobacteria</i>	0,67
<i>Spirochaetes</i>	0,46
<i>DSS1</i>	0,35
<i>Fibrobacteres</i>	0,13
<i>TM7</i>	0,13
<i>Cyanobacteria</i>	0,10
<i>Planctomyces</i>	0,08
<i>Deferribacteres</i>	0,05
<i>Lentisphaerae</i>	0,04
<i>Chloroflexi</i>	} 0,01
<i>SR1</i>	
<i>Deinoccus–Thermus</i>	

Die mikrobielle Besiedlung des GIT bei Schweinen und deren Entwicklung ist ein kontinuierlicher und sehr komplexer Prozess, der von mehreren Faktoren wie Wirt, Diät und Umwelt beeinflusst wird. Postnatal noch recht einfach strukturiert und in der Absetzphase sehr instabil, entwickelt sich die Mikrobiota im weiteren Verlauf zu einem dynamischen, vielfältigen und stabilen Mikroökosystem. Die Mikroorganismen stehen sowohl untereinander als auch mit dem Wirt in einer permanenten Interaktion und sind für das Tier überlebenswichtig.

2.2. Interaktionen zwischen intestinaler Mikrobiota und Wirt

Die Evolution des Säugetieres erfolgte als Koevolution mit seinem mikrobiellen Umfeld. Das Ergebnis dieses evolutionären Prozesses ist unter anderem die natürliche Besiedlung des GIT (Ley *et al.*, 2008). Die intestinale Mikrobiota wird als metabolisch aktives „Organ“ bezeichnet, das in vielen biochemischen Reaktionen und Prozessen eine wichtige Rolle spielt (Hooper *et al.*, 2002; Backhed *et al.*, 2005). Da das Tier nicht in der Lage ist, körpereigene Enzyme zur Hydrolyse von Nahrungsbestandteilen wie Cellulose, Xylane und Pektine zu bilden, können diese nur mit Hilfe mikrobieller Enzyme abgebaut werden. Während Kohlenhydrate den Darmmikroorganismen als Hauptnahrungsquelle dienen, können ebenso einige Proteine aus dem Futter sowie der endogenen Sekretion (z. B. Mucine) als Nahrungssubstrate genutzt werden (Louis *et al.*, 2007). Durch die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen entstehen flüchtige Fettsäuren (FFS) - vorwiegend Essig-, Propion- und Buttersäure, Gase wie z. B. CO₂, H₂, NH₃, CH₄ (Bach Knudsen *et al.*, 1991; Chassard *et al.*, 2008) und Vitamine des B-Komplexes und Vitamin K (Hill, 1997; Stanton *et al.*, 2005). Mikrobielle Stoffwechselprodukte wie Milchsäure, Ethanol, Bernstein- und Ameisensäure werden in FFS, CO₂ und H₂ umgewandelt und freigesetzt (Blaut und Clavel, 2007). Bei Schweinen werden die FFS zum größten Teil im Dickdarm in einem Verhältnis von ca. 60 % Essig-, 25 % Propion- und 15 % Buttersäure produziert (Bach Knudsen *et al.*, 1991). Das Mengenverhältnis der FFS hängt jedoch von der wirtsspezifischen Zusammensetzung der Darmmikrobiota sowie den in der Diät enthaltenen unterschiedlichen Kohlenhydratquellen ab (Macfarlane und Macfarlane, 2003). Die FFS werden aus dem Darmlumen schnell absorbiert. Buttersäure ist nicht nur die Hauptenergiequelle der Kolonozyten, sondern spielt auch eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Differenzierung des Darmepithels. Propion- und Buttersäure werden in der Leber für die Glukoneogenese verwendet (Cook und Sellin, 1998; Wong *et al.*, 2006). Essigsäure fungiert z. B. als Energiequelle für die Myozyten (Wong *et al.*, 2006). Weiterhin wurde in unterschiedlichen Untersuchungen an wachsenden Schweinen festgestellt, dass die FFS 15 – 24 % vom täglichen gesamten Energiebedarf für den Wirt liefern (Dierick *et al.*, 1989; Yen *et al.*, 1991; Mcburney und Sauer, 1993; Anguita *et al.*, 2006). Die FFS weisen neben einer Vielzahl regulatorischer Eigenschaften eine protektive Wirkung gegen pathogene Bakterien auf (Wong *et al.*,

2006). Studien an keimfreien Tieren zeigten, dass die intestinale Mikrobiota bedeutenden Einfluss auf die physiologische und morphologische Entwicklung des GIT hat (Shirkey *et al.*, 2006; Chowdhury *et al.*, 2007; Willing und Van Kessel, 2009). Somit beeinflusst die intestinale Mikrobiota nicht nur die gesamte Nährstoffverdaulichkeit, sondern hat außerdem eine positive Wirkung auf die Entwicklung der Darmschleimhaut und das Immunsystem. Des Weiteren verhindert die autochthone Mikrobiota die Vermehrung der opportunistisch pathogenen Mikroorganismen im GIT. Der Vorgang wird als Kolonisationsresistenz bezeichnet (Berg, 1996). Unter diesen Aspekten betrachtet, können die Interaktionen zwischen dem Wirt und den im Darm vorkommenden Keimen als mutualistisch bezeichnet werden (Hooper und Gordon, 2001).

Durch ein ausgeglichenes Wechselverhältnis zwischen intestinaler Mikrobiota und Wirt - im vorliegenden Fall dem Schwein - entsteht ein komplexes Gleichgewicht, in dem die Diversität, die Funktionen und die Aktivitäten der prokaryontischen Mikroorganismen relativ gut beschrieben und untersucht worden sind. Im Verdauungstrakt der Menschen und Tiere kommen aber auch eukaryontische Mikroorganismen - z. B. Hefen - vor. Der Kenntnisstand über das Vorkommen von intestinalen Hefen und deren Funktion in dieser ökologischen Nische ist jedoch noch sehr unvollständig und mangelhaft.

2.3. Vorkommen und Wirkung von Hefen im Gastrointestinaltrakt von Menschen und Tieren

Ein überwiegender Anteil der Fungi (Pilze) im Ökosystem wird durch Hefen vertreten, deren Vielfalt innerhalb der Abteilungen Schlauchpilze (*Ascomycota*) und Basidienpilze (*Basidiomycota*) auf etwa 1.500 bekannte Spezies geschätzt wird. Des Weiteren wird vermutet, dass nur 1 % der lebenden Hefearten beschrieben sind (Kurtzman und Fell, 2006). Diese einzelligen Mikroorganismen besiedeln eine Vielzahl unterschiedlicher ökologischer Nischen - z. B. Boden, Süßwasser und das Meeresökosystem sowie die Phyllosphäre (Rosa und Peter, 2006). Zum Teil sind sie in der Lage, unter recht widrigen Bedingungen wie z. B. extrem hohen oder niedrigen Temperaturen oder einem sehr sauren Milieu zu existieren (Raspor und Zupan, 2006). Auf Grund ihres ubiquitären Vorkommens sind Hefen normalerweise auf der Haut und im Verdauungstrakt von gesunden Menschen und Tieren anzutreffen (Martini, 1992; Kam und Xu, 2002), ohne dabei gleichzeitig als Krankheitserreger in Erscheinung zu treten. Einige Arten der Gattungen *Candida* (Fidel *et al.*, 1999), *Cryptococcus* (Huston und Mody, 2009), *Rhodoturula* (Tuon und Costa, 2008), *Pityrosporum* (*Malassezia*) (Aspres und Anderson, 2004), *Trichosporon* und *Geotrichum* (Girmenia *et al.*, 2005) werden jedoch als fakultativ pathogene Hefen bezeichnet (Spencer und Spencer, 1997), die bei immunsupprimierten Individuen bzw. nach einer langen Antibiotikumbehandlung schwere Krankheiten verursachen und sogar zum Tode führen können (Richardson, 2005; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2009). Beim Einsatz zugelassener Hefespezies (meistens *Saccharomyces cerevisiae*) in der Tier- und Humanernährung, entweder als Probiotika oder Therapeutika, ist eine positive Einflussnahme auf das gastrointestinale Ökosystem zu verzeichnen (Buts und De Keyser, 2006; Czerucka *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2009; Buts, 2009).

In erstaunlicher Artenvielfalt und Populationsdichte kommen die Hefen im GIT von Insekten vor (Boekhout, 2005; Suh *et al.*, 2005; Molnar *et al.*, 2008). In neuen Studien fanden Gatesoupe (2007) und Scupham *et al.* (2006) Hefen im Darm von Fischen und Mäusen, wobei die Autoren dem intestinalen Vorkommen von Hefen eine wichtige, bisher unbekannte Bedeutung zuschreiben. Der heutige Wissensstand über intestinale Hefen bei monogastrischen landwirtschaftlichen Nutztieren beruht fast ausschließlich auf alten Befunden aus den 50er und 60er Jahren.

Die Entwicklung der Hefen im GIT verläuft in gleicher Weise wie bei den Bakterien. Die Hefen werden mit dem Futter oder Kot aus der Umgebung oral aufgenommen. Jedoch nicht alle Hefearten passen sich den im Darm vorherrschenden Verhältnissen an. So werden einige entweder während der Magen–Darm-Passage verdaut oder finden keine geeigneten Bedingungen für Wachstum und Vermehrung. Das Vorkommen von vermehrungsfähigen Hefen im Verdauungstrakt einzelner Tierarten ist wirtsspezifisch (Parle, 1957; Van Uden *et al.*, 1958; Van Uden, 1960; Martini, 1992). Dabei wird ihr quantitatives Auftreten bei den einzelnen Individuen oder Tierarten von verschiedenen Faktoren wie z. B. der Zusammensetzung des Futters und der vorhandenen bakteriellen Populationen beeinflusst (Mehnert und Koch, 1963).

2.4. Vorkommen von Hefen im Gastrointestinaltrakt des Schweines

Die intensivere Untersuchung der Hefepopulation im GIT des Schweines begann in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts. Dabei beruhten die Studien auf diversen Kultivierungsverfahren. Van Uden *et al.* (1958) und Van Uden & Carmo–Sousa (1957a) haben caecale Proben einer großen Tierzahl (252 Rinder, 252 Pferde, 503 Schafe, 250 Ziegen und 250 Schweine) auf eine Hefebesiedlung untersucht. Unter allen geprüften Tierarten wiesen Schweine mit 88,8 % den höchsten Anteil an Hefen (Rinder 46,8 %, Pferde 52,4 %, Schafe 6,8 %, Ziegen 6,4 %) auf. Dabei konnten bei den Schweinen Hefearten wie *Candida slooffiae*, *Candida albicans*, *Saccharomyces telluris* (*Candida bovina*), *Torulopsis glabrata* (syn. *Candida glabrata*) und *Trichosporon cutaneum* identifiziert werden. *C. slooffiae* wurde am häufigsten (48,4 %) isoliert. Diese Spezies wurde zum ersten Mal bei 6 von 252 Pferden gefunden (Van Uden und Carmo-Sousa, 1957b). In späteren Studien kamen die Autoren (Van Uden *et al.*, 1958; 1960; Van Uden und Carmo-Sousa, 1962a; Mehnert und Koch, 1963) auf Grund der Häufigkeit des Auftretens (etwa 50 – 75 % der Tiere) und der hohen Konzentration im Verdauungstrakt von Schweinen zu dem Schluss, dass diese Hefeart eher für Schweine als für Pferde spezifisch ist. Dies bestätigt auch das Vorkommen dieser Hefespezies bei Wildschweinen (Van Uden und Carmo-Sousa, 1962b). Untersuchungen einzelner Abschnitte des GIT von insgesamt 57 Schweinen zeigten eine außergewöhnliche hohe tierindividuelle Variabilität an Hefebesiedlung (Van Uden und Carmo-Sousa, 1962a). Während andere Hefearten

nur gelegentlich vorkamen, fanden Van Uden und Carmo–Sousa (1962a) bei den 27 untersuchten Tieren einen Keimzahlanstieg der Spezies *C. slooffiae* im Bereich von 10^2 – 10^3 KBE/g Ingesta im Magen bis zu 10^6 KBE/g Darminhalt im Rektum. Ein noch höheres Hefevorkommen, sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Sicht (bis 10^7 KBE/g), wiesen Mehnert und Koch (1963) im Verdauungstrakt bei 96 von 100 untersuchten Schweinen nach. Neben der dominanten *C. slooffiae*, deren Anteil 75 % betrug, waren *C. krusei* bei 60 %, *S. telluris* bei 26 %, *C. albicans* bei 9 %, *C. glabrata* bei 4 %, *C. tropicalis* und *C. parapsilosis* jeweils bei 3 % und *T. pintolopesii* bei 2 % der Tiere anzutreffen. Im Gegensatz zu anderen intestinal vorkommenden Hefespezies, die auch in anderen ökologischen Nischen außerhalb des Warmblüterorganismus überleben können, ist *C. slooffiae* nur im Darm eines warmblütigen Wirts überlebens- und entwicklungsfähig (Mehnert und Koch, 1963).

2.5. Gezielter Einsatz von Hefen in der Ernährung von Mensch und Tier

Seit langer Zeit wird die Hefe der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* auf Grund des hohen Gehaltes an Vitaminen des B-Komplexes, Proteinen, Peptiden, essentiellen Aminosäuren und Spurenelementen in der Tier- und Humanernährung eingesetzt (Fleet, 2006; Bekatorou *et al.*, 2006). Neben den traditionell verwendeten Bier- und Backhefen finden auch andere Hefearten wie z. B. *Kluyveromyces marxianus* in abgetöteter Form als proteinhaltige Futtermittel ihre Verwendung (Lukondeh *et al.*, 2003; Spark *et al.*, 2005; Bekatorou *et al.*, 2006). In Folge der konventionellen Verabreichung von Hefen in lebender Form sind gesundheitsfördernde und immunmodulierende Wirkungen auf das Darmmikroökosystem beobachtet worden. In langjährigen Untersuchungen bewährten sich definierte Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* sowie in der Humanmedizin die verwandte Spezies *Saccharomyces* (*S.*) *boulardii* als probiotische Präparate. In verschiedenen Ländern wird *S. boulardii* als Arzneimittel zur Prophylaxe und Therapie von diversen Verdauungsstörungen angewandt. Hierzu zählen vor allem Durchfälle, die mit einem Antibiotikum-Einsatz assoziiert sind oder durch schwere Infektionen insbesondere mit *Clostridium difficile* ausgelöst werden (Buts und De Keyser, 2006; Czerucka *et al.*, 2007; Zanello *et al.*, 2009; Buts, 2009).

Untersuchungen von Jouany *et al.* (1998), Fonty und Chaucheyras-Durand (2006), Moallem *et al.* (2009) und Oeztuerk und Sagmanligil (2009) zeigten, dass die direkte

Verfütterung lebender Hefen an Wiederkäuer die Verdauungseffizienz der Mikroorganismen im Pansen sowie die Gesundheit und die Produktivität des Wirtes im Allgemeinen verbessern können. Ebenso konnte eine modifizierende Wirkung auf das Mikroökosystem des Dickdarmes von Pferden (Medina *et al.*, 2002) und eine positive Beeinflussung der Rohfaserverdaulichkeit auf die Verabreichung von probiotischen Hefen zurückgeführt werden (Jouany *et al.*, 2008; 2009).

Nach dem EU-weiten Anwendungsverbot von Antibiotika als ALF wurde verstärkt das Potenzial von Hefen, Hefekulturen (Hefe mit ihren Fermentationsmetaboliten) und Präparaten auf der Basis von Hefezellwänden als Alternative zu den ALF in der Absetzphase bei Ferkeln untersucht (Van der Peet-Schwering *et al.*, 2007). Diesbezüglich liegen kontroverse Ergebnisse vor. In einigen Studien wurde nach der Supplementierung von lebenden Hefen (Jurgens *et al.*, 1997; van Heugten *et al.*, 2003) und Hefekulturen (Mathew *et al.*, 1998; Shen *et al.*, 2009) eine verbesserte Wachstumsleistung der Absetzferkel erreicht, während in anderen Untersuchungen keine Effekte nachgewiesen wurden (Kornegay *et al.*, 1995).

Abgesehen von den bereits erwähnten Bestandteilen beinhalten die Hefezellwände verschiedene Polysaccharide: 29 – 64 % β -Glucane, 31 – 40 % Mannane und 1 – 2 % Chitin in der Trockenmasse. Allerdings variiert der jeweilige Komponentenanteil sowie dessen Struktur und chemische Zusammensetzung zwischen den Hefestämmen und in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen sehr stark (Kath und Kulicke, 1999; Aguilar-Uscanga und Francois, 2003; Jaehrig *et al.*, 2007). In mehreren Studien konnte geschlussfolgert werden, dass eine Supplementierung von Mannan-Oligosacchariden (Davis *et al.*, 2004; Rozeboom *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2008) und β -Glucanen (Li *et al.*, 2006) oder β -Glucanen in Kombination mit Vitamin C (Eicher *et al.*, 2006) eine immunmodulierende Wirkung sowie einen positiven Effekt auf die Gesundheit der Absetzferkel hat.

Dennoch, die genaue Wirkungsweise von lebenden und abgetöteten Hefen bzw. deren Zellwandbestandteile auf die Gesundheit der Tiere ist nicht komplett erforscht und benötigt weitere Untersuchungen.

2.6. Methoden zur Untersuchung der Hefen

Bei Hefen, sowohl Ascomyceten als auch Basidiomyceten, findet vorwiegend eine vegetative Vermehrung durch Sprossung oder Spaltung statt (Kurtzman und Fell, 1998). Die ursprüngliche Charakterisierung der Hefen und ihre Nomenklatur stützen sich auf die morphologischen Merkmale und die verschiedenen biochemischen, phänotypischen Verfahren, die im Grunde genommen vor allem auf der Fähigkeit von Hefen basieren, kohlenstoffhaltige Substanzen zu assimilieren und zu fermentieren (Jarrow, 1998; Kurtzman, 1998; Pincus *et al.*, 2007).

Die Taxonomie der Hefen befindet sich in einem ständigen Umbruch, da kontinuierlich neue Spezies entdeckt werden. Zudem erfolgte die bisherige Klassifizierung auf Grundlage von phänotypischen Eigenschaften, die mit klassischen Kultivierungsmethoden untersucht wurden und häufig zu einer aus heutiger Sicht falschen Einordnung in die Taxonomie führten (Barnett *et al.*, 1990). Mit den heutigen modernen Methoden, die auf genotypischen Eigenschaften beruhen, bedürfen viele Stämme einer aufwändigen Reklassifizierung (Kurtzman und Fell, 2006).

Untersuchungen, mit den in den letzten Jahren entwickelten neuen molekularbiologischen Methoden, liefern in wesentlich kürzerer Zeit präzisere und eindeutige Ergebnisse (Kurtzman und Fell, 2006). Zudem ist für die genaue Identifizierung der Mikroorganismen eine Sequenzierung bestimmter DNA-Regionen unumgänglich. Die online zugänglichen DNA-, RNA- und Protein-Datenbanken wie z. B. die Datenbank vom National Center for Biotechnology Information¹ (NCBI-Datenbank) ermöglichen einen schnellen Vergleich von Sequenzen sowie die Erforschung von evolutionären Prozessen. Außerdem werden die Sequenzen für die Entwicklung von spezies- oder gruppenspezifischen bzw. universalen Primern und Sonden verwendet. Im Folgenden sollen einige grundlegende molekularbiologische Verfahren näher erläutert werden.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2.6.1. Identifizierung und Bestimmung der Biodiversität

Zur Identifizierung sowie Erforschung der Verwandtschaftsbeziehungen von Hefen werden am häufigsten ribosomale Desoxyribonucleinsäuren (rDNA) herangezogen, deren hochkonservative Genregionen von variablen, speziesspezifischen Domänen separiert werden. Die rDNA Regionen bestehen aus Genen, die eine kleine (SSU) 18S, 5,8S und eine große Untereinheit (LSU) 26S der ribosomalen DNA kodieren, welche von nicht kodierenden Bereichen, „internal transcribed spacers“ ITS1 und ITS2 (Chen *et al.*, 2000) (Abb. 3), separiert werden (James *et al.*, 1996; Pincus *et al.*, 2007).

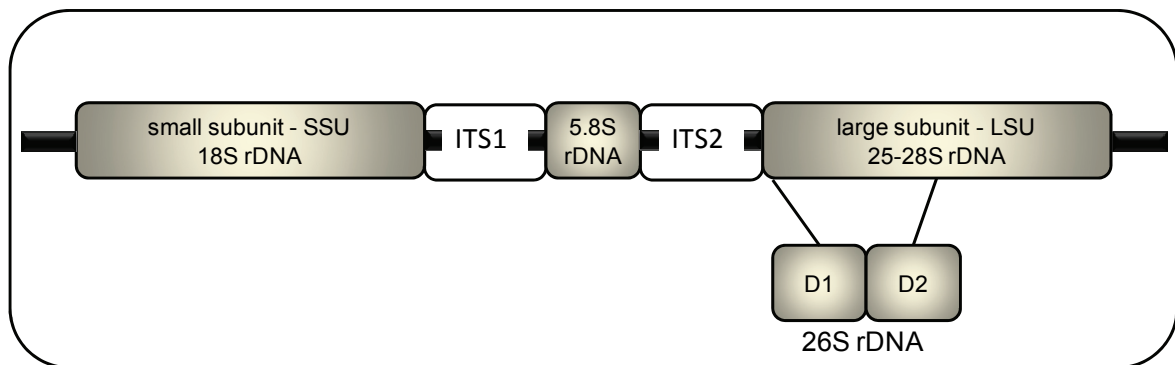


Abb. 3: Schematische Darstellung von amplifizierenden Regionen: 18S, 5,8S rDNA sowie der D1 & D2 Domäne der 26S rDNA und ITS 1 & ITS 2 (internal transcribed spacer) nach Pincus (2007)

Die 18S rDNA Region ist im Allgemeinen zu konservativ für die Differenzierung der Spezies, jedoch von großer Bedeutung für die phylogenetische Analyse auf Gattungs– und höherer Taxaebene (James *et al.*, 1996; 2001; Kurtzman und Robnett, 2003).

Peterson und Kurtzman (1991) zeigten, dass sich die Nukleotidsequenzen einer Spezies in der D2 Domäne weniger als 1 % unterscheiden und die Sequenzanalyse der beiden Domänen D1 & D2 der 26S rDNA (etwa 600 Nukleotide) ausreichend variabel für die genaue Identifizierung der vielen Spezies sind (Kurtzman und Robnett, 1997; 1998). Die sowohl in der Studie mit ca. 500 Hefespezies der Abteilung *Ascomycota* (Kurtzman und Robnett, 1998) als auch aus weiteren Studien mit Basidiomyceten (Fell *et al.*, 2000; Scorzetti *et al.*, 2002) ermittelten Sequenzen der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA erweiterten die Gendatenbank bedeutend.

Die ITS1 und ITS2 Regionen wurden ebenso effektiv wie die D1 & D2 Domänen der 26S rDNA für die Identifikation und Klassifikation der Spezies verwendet (Kurtzman und Robnett, 2003; Suezawa *et al.*, 2006). Unter vielen Hefen der Abteilung *Basidiomycota* fanden Scorzetti *et al.* (2002) eine bessere Abgrenzung der Spezies bei den ITS Sequenzen im Vergleich zu D1 & D2, jedoch wurden einige Arten in D1 & D2 effektiver als in den ITS Regionen differenziert. Obwohl die Gendatenbank von 26S rDNA umfangreicher als die von ITS ist (Pincus *et al.*, 2007), werden zunehmend die ITS Regionen für die Identifizierung der pathogenen Hefen verwendet (Chen *et al.*, 2000; Pryce *et al.*, 2003; Leaw *et al.*, 2006; 2007). Schließlich ist für die genaue Identifikation, insbesondere bei engverwandten Spezies, eine Sequenzierung von beiden, den D1 & D2- und ITS-Regionen, zu empfehlen (Scorzetti *et al.*, 2002; Kurtzman und Fell, 2006).

Außer der exakten Speziesidentifikation unter Nutzung von spezifischen Primern erlauben einige molekularbiologische Methoden die Vielfalt der Mikroorganismen in unterschiedlichen ökologischen Nischen zu untersuchen. Anderson und Cairney (2004) haben einen ausführlichen Überblick über die verschiedenen molekularen Verfahren wie T/DGGE (temperature / denaturing gradient gel electrophoresis), SSCP (singlestrand conformation polymorphism), T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism), ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) und ARISA (amplified ribosomal intergenic spacer analysis) für die Erforschung der Ökologie der Pilze im Boden zusammengestellt.

Die denaturierende Gradientengelelektrophorese findet seit ihrer Einführung (Muyzer *et al.*, 1993) am häufigsten Verwendung für die Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaften und ermöglicht eine relativ schnelle und insbesondere kultivierungs-unabhängige Charakterisierung (Muyzer, 1999). Diese Methode wurde für die Erforschung der Hefen in Früchten (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004; El Sheikha *et al.*, 2009), Wein (Cocolin *et al.*, 2000; Urso *et al.*, 2008), Milch (Cocolin *et al.*, 2002) sowie in unterschiedlichen Nahrungsmitteln (Fleet, 2007) angewendet. In Abb. 4 ist eine schematische Prozessbeschreibung zur Durchführung der DGGE und eine mögliche Auswertung der Ergebnisse dargestellt. Bei der DGGE handelt es sich um eine Denaturierung bzw. Separierung der mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizierten DNA-Fragmente in Schmelzdomänen (melting domains), welche auf Grund interspeziesvariabler Nukleotidenzusammensetzung (Divergenzen in G+C-Gehalt) unterschiedliche Schmelztemperaturen in einem Polyacrylamid-Gel mit

isovertikalem Gradienten (Harnstoff und Formamid) aufweisen. Um die vollständige DNA–Denaturierung zu verhindern, wird zum 5' Ende eines für die PCR verwendeten Primers eine GC–Klammer (GC-reicher Sequenz ca. 30 – 50 bp) eingefügt (Muyzer und Smalla, 1998). Da die GC-reichen Fragmente deutlich höhere Schmelztemperaturen enthalten, bleiben die Sequenzen während des Gellaufes im teilgeschmolzenen Zustand auf spezifischen Positionen hängen. Nach Färbung mit einem Farbstoff (z. B. SYBR–Gold) zeigen sie auf einer unter UV-Licht fotografierten Aufnahme ein bestimmtes Laufprofil (Abb. 4b).

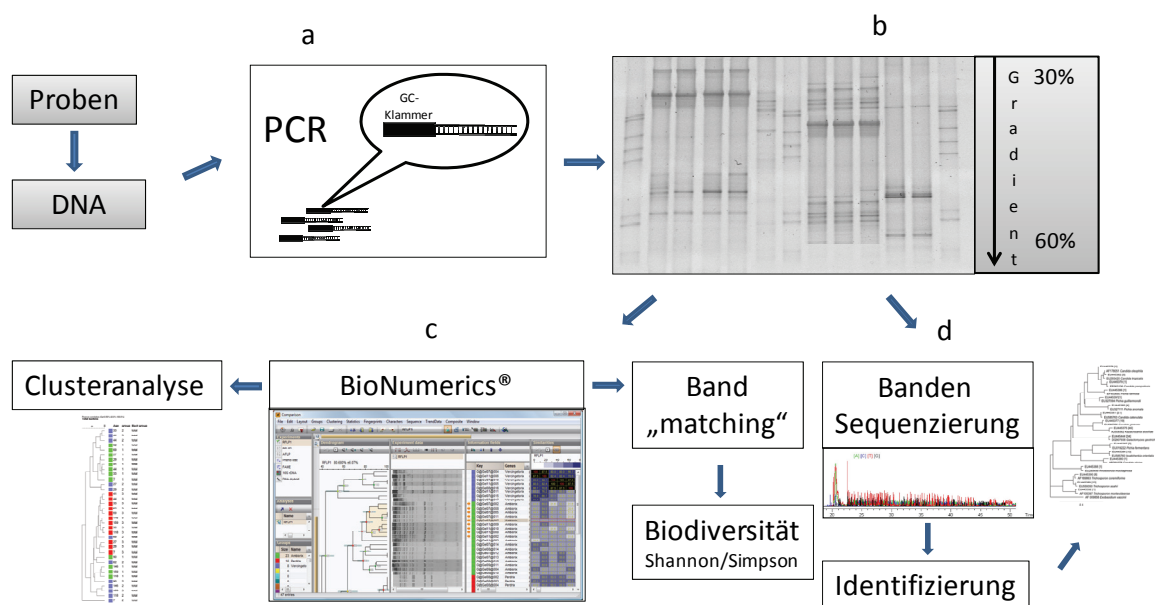


Abb. 4: Prozessbeschreibung zur Durchführung der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE) und eine mögliche Auswertung der Ergebnisse. Die mit GC–Klammer amplifizierten PCR–Fragmente (a) denaturieren in einem Polyacrylamid–Gel (b) mit isovertikalen Gradienten (hier 30 – 60 %, vorwiegend bestehend aus Harnstoff und Formamid). Die Bilder der DGGE–Profile werden mit dem Programm BioNumerics® (c) statistisch analysiert (Clusteranalyse und Beschreibung der Biodiversität). Die betreffenden Banden (b) werden ausgeschnitten (d) und sequenziert. Die DNA–Fragmente können nach der Sequenzierung für eine Identifizierung sowie phylogenetische Analyse verwendet werden.

Einen statistischen Vergleich der DGGE–Profile innerhalb eines Gels sowie mehrerer Gele ermöglicht eine dafür geeignete Software, wie z. B. das in der Abb. 4c dargestellte Programm „BioNumerics®“ (Applied Maths, Sint–Martens–Latem,

Belgien). Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind die Grundlage für die Durchführung der Clusteranalyse, die unter anderem auf der Basis der Ähnlichkeitskoeffizienten (similarity coefficient) sowie der kurvenbasierenden „Pearson product–moment correlation“ oder dem bandenbasierenden „Dice-index“ ermittelt wurde. Weiterhin können die Daten der relativen Bandenpositionen, die mittels der Funktion „band matching“ exportiert werden, für die Berechnung der Biodiversität verwendet werden. Im Allgemeinen betrachtet man dabei eine Bande als eine Spezies. Dies würde jedoch unter Umständen zu einer falschen Bewertung führen, da mitunter von einigen Spezies mehr als eine Bande gebildet wird (Muyzer und Smalla, 1998). Eventuell denaturieren Sequenzen engverwandter Spezies im gleichen Bereich, so dass allein anhand der Bandenposition keine Identifikation einer einzelnen Spezies möglich ist. Um eine genaue Identifizierung der Banden bzw. Sequenzen zu ermöglichen, müssen die betreffenden Banden ausgeschnitten und sequenziert werden (Ercolini, 2004).

Gegenwärtig schenken viele Wissenschaftler der Entwicklung oder Adaptation von molekularen Methoden zur schnelleren und zuverlässigen Identifizierung der Hefen hohe Beachtung. Diese Kenntnisse allein sind jedoch ohne quantitative Angaben für die umfassende Charakterisierung der jeweiligen Hefeart bzw. Hefepopulationen im entsprechenden Milieu nicht ausreichend.

2.6.2. Quantifizierung

Die modernen Methoden der Real–Time quantitative PCR und der Fluoreszenz–in–situ–Hybridisierung finden in der letzten Zeit zunehmend Anerkennung als schnelle und effektive Verfahren zur Beurteilung der mikrobiellen Dynamik im entsprechenden Untersuchungsmaterial. Beide Methoden beruhen im Grunde genommen auf der Detektion und Quantifizierung der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten regionspezifischen Nucleinsäuren.

Hinsichtlich der Hefeforschung wurde die RTQ-PCR bisher zur Quantifizierung der Hefen in Wein (Delaherche *et al.*, 2004; Martorell *et al.*, 2005; Hierro *et al.*, 2006; 2007; Salinas *et al.*, 2009), Milchprodukten (Bleve *et al.*, 2003; Larpin *et al.*, 2006) und humanen Faeces (Chang *et al.*, 2007) angewendet. Smith und Osborn (2009) geben eine Übersicht über die theoretische und praktische Anwendung der RTQ–PCR. Zusammengefasst handelt es sich bei der RTQ–PCR um eine Methode, die

auf der herkömmlichen Polymerase–Kettenreaktion basiert. Während des RTQ–PCR–Ablaufs interkalieren die zugegebenen Fluoreszenzfarbstoffe (z. B. SYBR Green I) in die amplifizierte DNA–Zielsequenzen. Auf der Basis der erworbenen Fluoreszenzeigenschaften können die Sequenzen während der RTQ-PCR erfasst werden. Um die Quantifizierung zu ermöglichen, ist es notwendig, Standardkurven zu erstellen, welche sich aus der Amplifikation der jeweiligen bekannten Templatemenge ergeben. Inzwischen ist die Entwicklung und Verwendung spezifischer, mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Hybridsonden fortgeschritten, so dass eine genaue Identifizierung und Quantifizierung der einzelnen Spezies sowie der mikrobiellen Gemeinschaften zeitgleich in einer PCR–Reaktion (multicolour, uni/multiplex RTQ–PCR) möglich ist (Luo und Mitchell, 2002; Huang *et al.*, 2007; Innings *et al.*, 2007; Schroeder und Nitsche, 2009).

Fluoreszenz–in–situ–Hybridisierung stellt ein kultivierungsunabhängiges Verfahren dar, das eine Detektion, Identifizierung sowie Visualisierung und Quantifizierung der individuellen Zellen direkt in einer Probe erlaubt (Amann *et al.*, 2001). Gegenüber der oben beschriebenen RTQ-PCR ist zur Durchführung der FISH keine Amplifikation der Sequenzen notwendig, dafür wird möglichst frisches Probenmaterial - z. B. Kot - verwendet. Diese Methode basiert darauf, dass eine fluoreszenzmarkierte Sonde im Mikroorganismus an ihre Ziel-rRNA-Sequenz hybridisiert. Dadurch sind die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennbar und können z. B. mittels der so genannten Durchflusszytometrie (Flow Cytometry) (Veal *et al.*, 2000) automatisch detektiert und quantifiziert werden. In den letzten Jahren stieg die Bedeutung der FISH als schnelle und hochspezifische Methode für viele mikrobiologische, phylogenetische, ökologische und diagnostische Untersuchungen (Bottari *et al.*, 2006). In der Medizin wird die FISH–Technik vor allem auf Grund einer schnellen Detektion, Identifizierung (Rigby *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2005; Shepard *et al.*, 2008; Gherna und Merz, 2009) und Quantifizierung (Chang *et al.*, 1998) von pathogenen Hefen eingesetzt. Weiterhin wurde diese Methode erfolgreich zur Analyse von Hefen in Wein genutzt (Stender *et al.*, 2001; Xufre *et al.*, 2006; Roder *et al.*, 2007).

3. Resümee der Literaturübersicht und abgeleitete Zielstellung für die eigenen Untersuchungen

Im Verlauf der Evolution passten sich die verschiedenartigen Mikroorganismen dem vorherrschenden Milieu des tierischen Gastrointestinaltraktes an, woraus sich eine mutualistische Symbiose zwischen der Mikrobiota und dem Wirt entwickelt hat. Die Entwicklung der intestinalen Mikrobiota ist ein kontinuierlicher und sehr komplexer Prozess, der von mehreren Faktoren wie Wirt, Diät und Umwelt beeinflusst wird. Nach der Geburt recht einfach strukturiert und in der folgenden Absetzphase sehr instabil, entwickelt sich die Mikrobiota im weiteren Verlauf zu einem dynamischen, vielfältigen und stabilen Mikroökosystem.

Die Darmmikrobiota der Schweine besteht größtenteils aus Bakterien, deren Entwicklung und Einflussnahme auf die Gesundheit des Wirtes gut beschrieben sind. Auf Grund ihrer hohen Relevanz stehen sie immer wieder im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Den im Darm vorkommenden Hefen wird dagegen eine untergeordnete Rolle zugewiesen. Im Allgemeinen wird in der Human- und Veterinärmedizin eine quantitative Steigerung der Hefen im gastrointestinalen Ökosystem negativ bewertet. Über ihre Aufgaben und Stoffwechselaktivitäten sowie ihren Einfluss bzw. ihre Wechselbeziehungen mit der bakteriellen Mikrobiota ist allerdings wenig bekannt. Eine umfassende Beurteilung der Wirkung von Hefen im Verdauungstrakt ist mit dem gegenwärtigen Kenntnisstand, der vorwiegend auf Befunden der klassischen Kultivierungsmethode aus den fünfziger und sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts beruht, unvollständig bzw. nicht möglich. Mit der Einführung der molekularbiologischen Methoden in die moderne Forschung eröffneten sich neue Möglichkeiten, die bereits erworbenen Kenntnisse zu erweitern.

Um die bestehenden wissenschaftlichen Erkenntnisse auf dem Gebiet der intestinalen Hefen bei Schweinen, die zurzeit noch sehr lückenhaft sind, zu vervollständigen, sollten folgende Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden:

- die Biodiversität und Zusammensetzung der Hefepopulation im GIT von Ferkeln der Deutschen Landrasse vor und nach dem Absetzen,

- der Einfluss der Umgebungs– bzw. Haltungsbedingungen auf die intestinale Hefepopulation,
- die quantitative Entwicklung der Hefen im Darm von Ferkeln nach dem Absetzen,
- die potenziellen Interaktionen zwischen Hefen und den Bakteriengruppen Enterobakterien, Enterokokken und Laktobazillen und
- die Stoffwechselaktivitäten der im Darm von Ferkeln dominierenden Hefen.

Zur Erreichung der genannten Ziele sollen bei den geplanten Untersuchungen und Analysen die klassischen kultivierungsabhängigen Verfahren (Keimzahlbestimmung sowie der Assimilations–, Fermentations- und Enzymtest) in Kombination mit molekularbiologischen Methoden (PCR–DGGE, DNA–Sequenzierung) zur Anwendung gebracht werden.

4. Eigene Untersuchungen: Tiere, Material und Methoden

4.1. Experiment A – Biodiversität und Charakterisierung der Hefepopulation im Darm von Absetzferkeln

Im Rahmen des EU-Projektes (FOOD-CT-2004-506144) „Feed for Pig Health“ wurde ein Fütterungsversuch mit dem Ziel durchgeführt, an Ferkeln die Wirkung von Pflanzen, Pflanzenteilen sowie pflanzlichen Extrakten und Produkten auf die Darmgesundheit und die intestinale Mikrobiota während und nach dem Absetzen zu beurteilen. Der Versuch wurde zeitgleich an zwei verschiedenen Standorten unter unterschiedlichen Produktions- und Haltungsbedingungen durchgeführt. Die aus diesen Versuchen gewonnenen Hefekulturen wurden für die weitere Charakterisierung verwendet. Weiterhin wurde der Einfluss der Umgebungs- bzw. Haltungsbedingungen auf die Hefepopulation untersucht. An beiden Standorten wurde dasselbe Futtermittel verwendet. Die beiden Standorte waren:

- Experimentalanlage Schwein (EAS) des Dummerstorfer Leibniz-Instituts für Nutztierbiologie (FBN) mit einem überdurchschnittlichen Hygiene- und Gesundheitsstatus sowie hochmoderner technischer Ausrüstung
- Kommerzielle Farm (KF) mit Schweinemast- und Aufzuchtanlage in Pankelow, mit konventionellen Haltungsbedingungen.

4.1.1. Versuchstiere, Fütterung und Haltung

Insgesamt 95 Ferkel der Rasse Deutsches Landschwein (DL) wurden für diesen Versuch verwendet. Um möglichst genetisch einheitliche Tiere für diese Untersuchungen zu haben, wurden in beiden Anlagen nur Nachkommen von einem Vatertier für die Versuche genutzt. In beiden Anlagen erfolgte die Abferkelung in Abferkelbuchten (Abb. 5), welche mit separaten Nippeltränken und Futterbereichen ausgerüstet und so gestaltet waren, dass sowohl Sauen als auch Ferkel eigene Bereiche zum Fressen und Ruhen hatten.



Abb. 5: Abferkelbuchten der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF)

Nach dem Absetzen wurden die Ferkel in Gruppenhaltung (EAS $n = 8 - 10$; KF $n \approx 20$ pro Box) aufgestellt. Die Boxen waren in beiden Anlagen mit Nippeltränken ausgerüstet. 68 Ferkel (KF $n = 33$, und EAS $n = 35$), die während der gesamten Säugezeit kein Mischfuttermittel erhalten hatten, wurden am 28. Lebenstag (LT) abgesetzt. Nach dem Absetzen wurden diese Tiere *ad libitum* mit einer einheitlichen Charge eines Ferkelaufzuchtfutters I gefüttert, das in der Mischanlage von Institute for Animal Science and Health in Lelystad hergestellt wurde. Die Zusammensetzung ist aus Tab. 2 ersichtlich.

Um die Differenzen im Hefevorkommen in Abhängigkeit von Milch oder von festem Futter zu untersuchen, wurden 27 Ferkel (KF $n = 18$ und EAS $n = 9$) 11 Tage länger (bis zum 39. LT) von den Sauen gesäugt. In dieser Zeit erhielten die Ferkel kein Mischfuttermittel.

Um jegliche weitere Beeinflussung der Mikrobiota auszuschließen, wurden keine Medikamente, weder zur Therapie noch zur Prophylaxe, verabreicht. Die Tiere wurden unter natürlichem Lichtregime (Tag und Nacht) mit ähnlicher Temperatur (22 ± 1 °C) und Luftfeuchtigkeit (60 – 70 %) in beiden Betrieben gehalten.

Tab. 2: Zusammensetzung des Ferkelaufzuchtfutters I¹ (Experiment A)

Futtermittel	%	Inhaltsstoffe	pro kg
Gerstenmehl	30,0	Trockenmasse [g]	888
Weizenmehl	29,7	Stärke + Zucker [g]	455
Molkepulver	8,0	Rohprotein [g]	191
Erbsen (44 % Stärke)	5,0	Asche [g]	55
Kartoffelprotein (Protastar)	5,0	Rohfett [g]	50
Soycomil® (Sojaproteinkonzentrat)	4,0	Rohfaser [g]	34
Maisstärke	4,0	Lysin [g]	12,5
Palmöl + Sojabohnenöl	3,1	K [g]	8,5
Weizenkleie	2,5	Threonin [g]	8,0
Sonnenblumenmehl	2,5	Methionin+Cystin [g]	7,8
Maiskleber	2,2	Ca [g]	7,2
Calciumcarbonat	1,02	Cl [g]	6,7
Melasse	1,009	P [g]	6,1
Monocalciumphosphat	0,78	Methionin [g]	4,4
Vormischung aus Vit/SE ²	0,4	Tryptophan [g]	2,5
L-Lysin-HCl (79 %)	0,34	Na [g]	2,5
NaCl	0,28		
Methionin (99 %)	0,11	Zn [mg]	90,0
Tryptophan (99 %)	0,031	Cu [mg]	20,0
Threonin (98 %)	0,030	NEF [MJ/kg]	10
Gesamt	100		

¹ Die Angaben zur Deklaration des Mischfuttermittels stammen aus dem EU-Projekt (FOOD-CT-2004-506144) „Feed for Pig Health“.

² Zusammensetzung der vitaminisierten Mineralstoffmischung in Tab. A 1

4.1.2. Schlachtung, Probennahme und –aufarbeitung

An insgesamt 24 Terminen, die über das Jahr verteilt waren, wurden jeweils 4 Ferkel, abgesetzte und nicht abgesetzte, von beiden Farmen am 39. LT nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und zum Tiertechnikum des FBN transportiert. Ein Ferkel

ist auf dem Transport verstorben. Unmittelbar danach erfolgte die intrakardiale Injektion von T61[®] (Intervet, Unterschleißheim, Deutschland). Nach Durchführung der Euthanasie wurde durch mediale Eröffnung der Bauchhöhle der gesamte GIT entnommen. Chymus wurde aus dem Ileum, welches als letztes Drittel des Dünndarmes definiert wurde, dem Caecum und dem Colon gesammelt, auf Eis gelagert und unmittelbar danach ins Labor transportiert, wo die weitere Aufarbeitung erfolgte.

4.1.3. Kultivierungsabhängige Mikrobiologie

Alle Kultivierungen erfolgten in einem S2 Labor an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II Typ HS 15 (Heraeus, Hanau, Deutschland) gemäß der Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen (Biostoffverordnung – BioStoffV²).

Alle biologischen Arbeitsstoffe³ sowie die verbrauchten Materialien wurden als potenziell infektiös betrachtet und vor der Entsorgung ordnungsgemäß autoklaviert.

4.1.3.1. Keimzahlbestimmung der Hefen im Chymus

Um die Hefekeimzahl zu bestimmen, wurden die frischen Chymusproben in physiologischer Natriumchloridlösung in Dezimalschritten verdünnt und das Inokulat der jeweiligen Verdünnungsstufe (10^{-1} - 10^{-5}) auf zwei Parallelplatten mit Sabouraud-2 %-Glucose-Agar (SGA) mit Chloramphenicol (50 mg/l) (MERCK, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen und 5 Tage bei 37 °C aerob inkubiert. Nach der Bebrütung wurden aus der Verdünnungsreihe die Platten für die Auszählung herangezogen, auf denen sich die nach der Koloniemorphologie auswertbaren, d. h. räumlich voneinander getrennten und gut zu differenzierenden Kolonien befanden. Die Auszählung wurde mit einem mechanischen Koloniezählgerät (SCHÜTT Labortechnik GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Die Berechnung der Keimzahl erfolgte unter Verwendung des Mittelwertes der beiden ausgezählten Parallelplatten und unter Berücksichtigung der jeweiligen

² <http://www.gesetze-im-internet.de/biostoffv/index.html>

³ Biologische Arbeitsstoffe sind Mikroorganismen, einschließlich gentechnisch veränderter Mikroorganismen, gefährdungspotentiale Zellkulturen und humanpathogene Parasiten, die beim Menschen Infektionen, sensibilisierende oder toxische Wirkungen hervorrufen können (BioStoffV).

Verdünnungsstufe. Als Ergebnis wurde somit die Keimzahl, angegeben als dekadischer Logarithmus der koloniebildenden Einheiten je Gramm Probe (lg KBE/g) erhalten.

4.1.3.2. Isolierung und Gewinnung der Reinkulturen von Hefen

Eine Beurteilung der Mikroorganismen hinsichtlich ihrer physiologischen, chemischen und genetischen Eigenschaften ist erst dann möglich, wenn die zu untersuchenden Populationen als gleichartige Individuen bzw. als Reinkultur⁴ vorliegen.

Die Herstellung der Hefereinkultur erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde etwas Zellmaterial von Einzelkolonien mit einer Impföse entnommen und durch Verdünnungsausstriche auf SGA-Platten vereinzelt. Die Inkubation erfolgte 3 – 5 Tage bei 37 °C. Die Prozedur wurde zweimal wiederholt. Nach dreimaligem Ausstreichen sind die morphologisch identischen Kolonien mit hoher Wahrscheinlichkeit als Reinkultur zu betrachten. Nach jedem Reinigungsausstrich wurden die Kolonien makroskopisch nach Größe, Form, Farbe und Oberflächenstruktur sowie mikroskopisch nach ihrer Morphologie beurteilt. Anschließend wurden die Stämme vermehrt und in Glycerin-Kryoröhrchen konserviert.

4.1.3.3. Konservierung von Hefekulturen

Die Kryokonserven wurden folgendermaßen hergestellt: wenig Zellmaterial der Hefereinkulturen wurden in Kryo-Röhrchen mit 1 ml Hefeextrakt-Malzextrakt-Bouillon (HMB) suspendiert und in einem Schüttelinkubator 1000 (Heidolph, Düsseldorf, Deutschland) 24 h bei 37 °C bebrütet. Das HMB-Medium hatte folgende Zusammensetzung:

- Hefeextrakt 3 g
- Malzextrakt 3 g
- Sojapepton 5 g
- Glucose 10 g
- *aqua dest.* 1 l

⁴ Unter einer Reinkultur versteht man eine Population von Mikroorganismen, die aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen und frei von andersartigen Mikroorganismen (Kontaminanten) ist (Bast, 2001).

Nach der Inkubation wurde visuell auf Trübung kontrolliert, bei ausreichender Vermehrung 350 µl Glycerin (60 %) zugegeben und gemischt. Die Konserven wurden bei –30 °C eine Stunde im Gefrierschrank eingefroren und schließlich bei –80 °C gelagert.

4.1.3.4. ID 32 C System

Das ID 32 C System (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) ist ein standardisiertes System zur Identifizierung der Hefen anhand von 32 Assimilationsreaktionen (Tab. A 3). Ein ID 32 C Streifen besteht aus 32 Vertiefungen, die unterschiedliche Substrate in dehydrierter Form enthalten. Für den Test wurden Reinkulturen aus Kryokonserven auf SGA-Platten zwei bis drei Tage (je nach Hefestamm) bei 37 °C erneut angezüchtet. Aus dem Zellmaterial wurde mit physiologischer NaCl-Lösung eine Suspension mit einer, dem McFarland Standard⁵ 2 (Tab. A 2) (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) entsprechenden, optischen Dichte hergestellt. Von dieser Suspension wurden 250 µl in eine Ampulle mit API C Medium pipettiert, homogenisiert und davon unverzüglich 135 µl Inokulum mit einer Pipette in die Vertiefungen des Streifens eingebracht. Die beimpften Streifen wurden in einer „feuchten Kammer“ zwei Tage bei 37 °C inkubiert. Nach Angaben des Herstellers sind die zu untersuchenden Mikroorganismen bei 29 ± 2 °C zu inkubieren. Um die Stoffwechselaktivitäten der Hefen im Schweinedarm nachvollziehen zu können, wurde von dieser Herstellerangabe abgewichen. Danach erfolgte die Auswertung, indem das Vorhandensein oder das Fehlen einer Trübung in jeder Vertiefung mit der negativen Wachstumskontrolle visuell verglichen wurde. Die stärkere Trübung wurde als positiv gewertet.

4.1.3.5. API ZYM Test

Für die Charakterisierung ausgewählter Hefen wurde das API ZYM System (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) verwendet. Der API ZYM Streifen besteht aus 20 Mikroküvetten bzw. Vertiefungen, die speziell zum semi-quantitativen Nachweis von 19 Enzymen (Tab. A 4) konzipiert sind, wobei eine Vertiefung als Kontrolle dient.

⁵ Der McFarland Standard ist eine Reihe von Bariumsulfat-Suspensionen mit verschiedenen optischen Dichten, die zur Konzentrationseinstellung von Keimsuspensionen verwendet wird.

Das System eignet sich für Mikroorganismen und andere biologische Materialien. Die Durchführung des Testes ist ähnlich wie bei dem ID 32 C System. Zunächst erfolgte, wie oben beschrieben, die Herstellung einer, dem McFarland Standard 5 (Tab. A 2) entsprechenden Hefesuspension (HS). Anschließend wurden 65 µl der HS in jede Mikroküvette des Streifens pipettiert. Inkubiert wurde in einer „feuchten Kammer“ 4,5 Stunden bei 37 °C.

Nach dem Inkubieren wurden in jede Mikroküvette jeweils ein Tropfen Reagenz ZYM A und ZYM B gegeben und eine 5 min Reaktionszeit für die Farbentwicklung abgewartet. Zur Beurteilung der Reaktionen wurden die Streifen 30 – 60 sec intensiv mit einer Lampe belichtet, um die negativen Reaktionen zu entfärben. Die Auswertung erfolgte durch Ablesen der Farbintensität (Tab. A 4) nach einer Skala von 0 bis 5. Farbreaktionen im Bereich von 3 bis 5 wurden als positiv gewertet. Um die Auswertung der Farbintensität zu präzisieren, wurden die ausgewerteten Streifen 18 Stunden bei Zimmertemperatur und Tageslicht stehen gelassen.

4.1.3.6. **Assimilationstest in Mikrotiterplatten**

Zur weiteren Charakterisierung der im Schweinedarm vorkommenden Hefen wurde der Assimilationstest durchgeführt, um im Vergleich zum ID 32 C mit einem breiteren Substratspektrum zusätzliche Energiequellen für das Wachstum der Mikroorganismen zu finden. Die Ausführung des Testes erfolgte nach den auf der Website⁶ von CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Niederlande) erhältlichen Anweisungen. Das Substratspektrum wurde in Anlehnung an Jarrow (1998) gewählt. Im Test wurden nur reine, für mikrobiologische Zwecke bestimmte Chemikalien verwendet (Tab. A 6).

4.1.3.6.1. **Durchführung des Assimilationstestes**

Für die Durchführung des Testes wurden folgende Media hergestellt.

- Basalmedium (BM): Yeast nitrogen base Medium “Difco” 10 g/100 ml *aqua bidest.*

⁶ <http://www.cbs.knaw.nl/yeast/defaultpage.aspx#2>

- Substratlösung (SL): 45 ml BM + 0,351 g bzw. ml der zu testenden Kohlenstoffquelle
- Reaktionsmedium (RM): 5 ml BM + 45 ml SL

Alle Lösungen, mit Ausnahme solcher mit löslicher Stärke und Inulin, wurden durch einen 20 µm Filter sterilisiert. Wegen einer hohen Viskosität und Temperaturempfindlichkeit wurde das durch Gammastrahlung sterilisierte Inulin (Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH, Radeberg, Deutschland) unter keimarmen Bedingungen in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit sterilem *aqua dest.* suspendiert. Um eine mögliche Hydrolyse der löslichen Stärke durch die Behandlung auszuschließen, wurde sie sowohl als autoklaviertes als auch tyndalisierte Substrat (siehe Abschnitt 4.1.3.7) getestet. Anschließend wurde das RM in sterile 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

Für den Assimilationstest wurden die 96-Well-Mikrotiterplatten (MP Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) folgendermaßen vorbereitet: in jede Vertiefung der MP wurden 150 µl des RM pipettiert. Die verwendeten Substrate und deren Position auf der MP können aus der Tab. A 6 entnommen werden.

Für die Herstellung der Hefesuspension (HS) wurde etwas Hefefrischkultur mit einer Impföse von der SGA-Platte genommen und in einem Röhrchen mit steriler 0,9 %iger NaCl-Lösung, dem McFarland Standard 2 (Tab. A 2) entsprechend, suspendiert. 50 µl HS wurden mit einer Achtkanalpipette in die mit unterschiedlichen Substraten befüllten Vertiefungen der MP pipettiert.

4.1.3.6.2. Inkubation, Messung der optischen Dichte

Um das Austrocknen der Medien zu vermeiden, wurden die Platten in sterile Plastiktüten mit einem Folienschweißgerät (HAWO, Mosbach, Deutschland) eingeschweißt. Zum Zeitpunkt der Messungen wurden die Platten aus den Tüten entnommen und nach den Messungen wieder eingeschweißt. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C in einem Schüttelinkubator 1000 (Heidolph, Düsseldorf, Deutschland). Die Extinktion der beimpften Vertiefungen wurde nach der Inokulation für die Feststellung des Ausgangspunktes, sowie nach 24-, 48-, 72- und 96-stündiger Inkubation im Mikroplatten-Reader Sunrise™ (Tecan, Männedorf, Deutschland) mit Hilfe der

Software Magellan (Tecan, Männedorf, Deutschland) bei 405 nm gemessen. Zur Kontrolle wurden die Platten vor jeder Messung visuell beurteilt und dokumentiert.

4.1.3.7. Fermentationstest

Das Prinzip des Testes beruht darauf, ob Gasbildung oder Farbänderung durch die Fermentierung der unterschiedlichen Kohlenhydrate stattfindet (Jarrow, 1998).

Die in unserem Versuch isolierten Hefen wurden auf die Fermentierung von D–Galactose, D–Glucose, D–Saccharose, D–Maltose, D–Lactose, D–Raffinose, D–Trehalose, Inulin, lösliche Stärke, D–Melibiose, D–Cellobiose und D–Xylose getestet.

Folgende Lösungen wurden im Test verwendet:

- Basalmedium (BM): Hefeextrakt (4,5 g/l) und Sojapepton (7,5 g/l)
- Stock Indikatorlösung (IL): 50 mg Bromthymolblau in 75 ml *aqua bidest.*
- Zuckerm Medien (ZM): BM + 2 % (bzw. 4 % bei Raffinose) vom jeweiligen Zucker + 0,4 ml/l sterile IL

Bromthymolblau wird im Labor oft als Indikator für eine pH-Wert-Änderung in Lösungen mit verschiedenen Testsubstraten eingesetzt. Alle ZM, außer das Inulin-Medium, wurden mit einer peristaltischen Schlauchpumpe PERIMATIC Jencons (Medizin- und Labortechnik Fritz GÖSSNER GmbH, Rostock, Deutschland) in zwei Kulturröhrchen (16 x 180 mm) je Zuckerart zu jeweils 9,0 ml gefüllt. Zum Auffangen des gebildeten Gases wurde ein umgekehrtes Durham-Röhrchen in jedes Reagenzglas (35 x 10 mm) gegeben. Die ZM wurden einer fraktionierten Sterilisation (Tyndallisation) unterzogen, die durch eine 20-minütige Erhitzung der Medien bei 100 °C im Dampfsterilisator (Varioklav) 75 S (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, Deutschland) an drei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wurde. Nach dem ersten und zweiten Erhitzen wurden die Proben zur Überprüfung auf das Vorhandensein noch lebender Keime im Inkubator bei 37 °C 12 Stunden lang bebrütet. Anschließend wurden die ZM bei Zimmertemperatur abgekühlt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Das Inulin-Medium wurde, wie oben beim Assimilationstest beschrieben, vorbereitet.

Die Hefesuspension (HS) wurde nach dem gleichen Prinzip wie beim Assimilationstest, dem McFarland Standard 5 (Tab. A 2) entsprechend, hergestellt. Die Beimpfung der ZM erfolgte durch Zugabe von 100 µl HS. Die beimpften Proben wurden bei 37 °C eine Woche lang bebrütet. Die Medien wurden täglich überprüft. Gasbildung sowie eine deutliche Farbänderung von Blau zu Gelb wurde als positives Ergebnis protokolliert.

4.1.4. Molekulare Mikrobiologie

4.1.4.1. Isolierung genomischer DNA aus Reinkulturen

Von den Glycerinkonserven wurden 50 µl Inokulum auf die SGA-Platten ausplattiert und bei 37 °C 3 – 5 Tage inkubiert. Nach der Bebrütung wurde von der Hefebiomasse mittels eines FastDNA® SPIN Kit's (MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland) entsprechend den Angaben des Herstellers DNA isoliert. Die DNA-Konzentrationen (ng DNA je µl) wurden mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Deutschland) bestimmt.

4.1.4.2. Polymerase-Kettenreaktion der eukaryotischen 26S rDNA

Für die Amplifikation der DNA-Fragmente der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA kam die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Anwendung. Dazu wurden die von Kurtzman und Robnett (1998) beschriebenen Primer NL1 (Forward) und NL4 (Reverse) benutzt (Tab. 3). Die Primer wurden durch Eurofins (MWG Operon, Deutschland) synthetisiert. Die PCR wurde unter Nutzung des Q-BioTaq CORE Kits (MP Biomedicals, Deutschland), der Taq DNA Polymerase, dNTP's Mix (Desoxynucleotidtriphosphate: bestehend aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und Inkubationspuffer (Tris HCl – 10 mM, pH – 9,0, KCl – 50 mM, MgCl₂ – 1,5 mM, Triton x 100 – 0,1 %, BSA 0,2 mg/ml) enthielt, durchgeführt. Das für die PCR benötigte *aqua bidest.* wurde autoklaviert und einer anschließenden 15-minütigen UV-Bestrahlung unterzogen. Die Template-DNA wurde mit DNA-freiem *aqua dest.* so verdünnt, dass die Endkonzentration 1 ng DNA/µl betrug.

Tab. 3: Primer für PCR in Experiment A

Name (bp)	Sequenz 5' – 3'
NL1 f (24)	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG
NL4 r (19)	GGT CGT TGT TTC AAG ACG G

Zur Durchführung der PCR mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden jeweils 49 µl Mastermix mit folgender Zusammensetzung in die Reaktionsgefäße gegeben:

- Inkubationspuffer: 5,00 µl
- Primer Forward (10 µM): 1,00 µl
- Primer Reverse (10 µM): 1,00 µl
- dNTP's (10 µM jeder): 1,00 µl
- Taq-Polymerase (5 U/µl): 0,25 µl
- PCR-aqua bidest.: 40,75 µl

Danach wurde 1 µl der Template-DNA einpipettiert und in einen MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BioRad, München, Deutschland) eingesetzt. Unter Nutzung nachfolgenden Programms (Tab. 4) wurde die PCR durchgeführt (Lopandic *et al.*, 2006).

Tab. 4: PCR-Programm in Experiment A

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	5 min	1
Denaturierung	98 °C	15 sec	} 35
Annealing	59 °C	60 sec	
Elongation	72 °C	120 sec	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1

Um mögliche Kontaminationen festzustellen, wurde immer eine Probe als Negativkontrolle (PCR-Mastermix ohne Template-DNA) angesetzt.

4.1.4.3. Gelelektrophoretische Analyse der PCR-Amplikons

Nach der Durchführung der PCR wurden die Amplikons (PCR-Fragmente) auf ein 2 %-iges Agarosegel übertragen, um mit Hilfe der Elektrophorese zu prüfen, ob die Amplifikation gelungen ist und um die Größe der Fragmente festzustellen. Dabei erfolgte die Elektrophorese in folgenden Arbeitsschritten. Die Agarose wurde im

1 x TAE-Puffer (Herstellung der Stammlösung siehe Tab. A 7) auf einer Induktionsplatte solange aufgeköcht, bis die Agarose gelöst war. Dann wurden 5 µl Ethidiumbromid (EtBr; 1 %) pro 100 ml Gellösung dazu gegeben und gründlich gemischt. Danach wurde die Lösung zum Polymerisieren in eine Gelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Abschluss der Polymerisation wurde das Gel in eine mit 1 x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophoresekammer (Agagel Midi-Wide; Biometra® GmbH, Göttingen; Abb. 6) überführt.

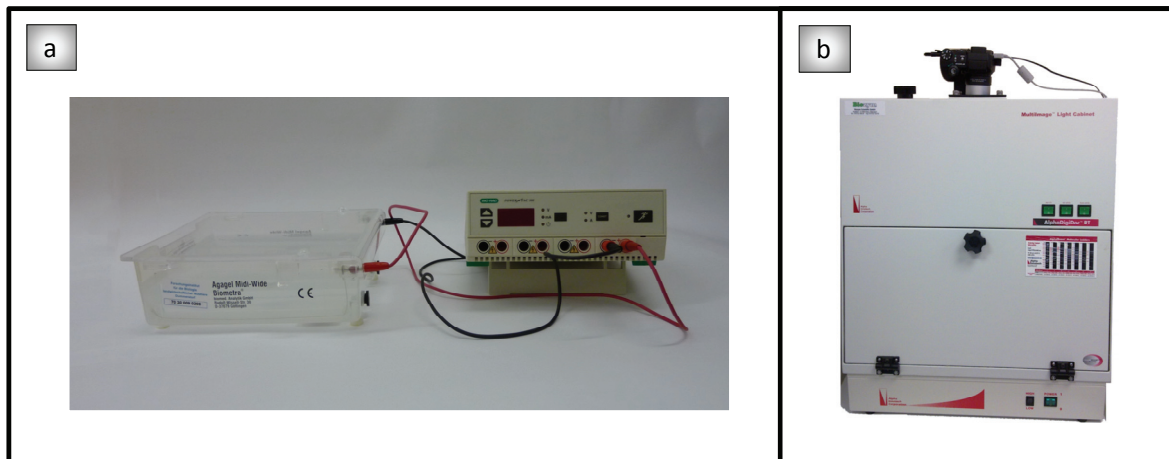


Abb. 6: Gelelektrophoresekammer Agagel Midi-Wide (a) und Geldokumentationssystem AlphaDigiDoc RT (b)

Fünf µl des Amplikons wurden mit 1 µl 10 x DNA Lader-Puffer SYBR-Green versetzt und mit einem Marker HyperLadder IV (von 100 bp – 1000 Kb - Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese dauerte bei 100 V eine Stunde. Die Gele wurden danach in einem Geldokumentationssystem AlphaDigiDoc RT (Abb. 6; Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) mit einer Digitalkamera SP-500 UZ (Olympus, Hamburg, Deutschland) unter Nutzung der Software AlphaEaseFC™ 4.0 (Alpha Innotech Corporation) fotografiert. Anhand der Aufnahme wurde die Größe der Amplikons durch Vergleich mit den Bandenpositionen des Markers bestimmt.

4.1.4.4. Sequenzierung der PCR-Amplikons

Die PCR-Produkte wurden mit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Arbeitsvorschriften des Herstellers gereinigt und

anschließend die Konzentration am Nanodrop ND–1000 Spektralphotometer (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Deutschland) gemessen.

Pro 100 bp Fragmentlänge wurden 5 ng der PCR–Produkte in sterile 0,2 ml–Eppendorf–Reaktionsgefäße pipettiert, mit SEQ–*aqua dest.* (HPLC rein) auf insgesamt 8 µl aufgefüllt und 0,5 µl des jeweiligen Primers (10 µM) NL1 und NL4 dazugegeben.

Die Sequenzierung erfolgte im Forschungsbereich Molekularbiologie des FBN unter Nutzung des MegaBACE™ Sequenzierung System (Amersham Biosciences, Piscataway, USA).

4.1.4.5. Alignment der Sequenzen

Zur Identifikation der Hefen wurden die ermittelten Sequenzen der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA unter Nutzung des BLAST–Suchalgorithmus (Basic Local Alignment Search Tool) mit der Gendatenbank auf der Website⁷ des NCBI (National Center for Biotechnology Information), wie bei Altschul *et al.* (1997) beschrieben, verglichen. Die für die phylogenetische Analyse verwendeten Sequenzen wurden mit dem vom NCBI entwickelten und auf dessen Website zur Verfügung gestellten Programm „Sequin“ (Benson *et al.*, 2008) für den Eintrag in die Datenbank des NCBI vorbereitet und gesendet.

4.1.5. Phylogenetische Analyse der Sequenzen

Die Sequenzen dieser Studie ebenso wie die Sequenzen von den nahe (zu mind. 97 %) verwandten Phylotypen aus der NCBI–Datenbank (Tab. A 5) wurden für die Erstellung der phylogenetischen Bäume benutzt. Dafür wurde die Software „Geneious 3.0“⁸ (Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland) verwendet. Zunächst wurden die globalen multiplen Alignments der Sequenzen erstellt. Dann wurden aus den Alignments die phylogenetischen Bäume nach der Neighbor–Joining–Methode (Saitou und Nei, 1987) und Bootstrapping (Stichprobenverfahren; Felsenstein (1985)) mit 1.000 Wiederholungen berechnet. Zur Berechnung der genetischen Distanzmatrix wurde das Tamura–Nei Modell (Tamura und Nei, 1993) gewählt. Eine

⁷ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

⁸ <http://www.geneious.com/>

Sequenz von *Exobasidium vaccinii* wurde als Außengruppe (Outgroup) in einen gewurzelten⁹ (rooted) phylogenetischen Baum integriert. Die Sequenzen von *Kazachstania slooffiae* wurden auf Intraspezies-Variationen analysiert und als ungewurzelter¹⁰ (unrooted) Baum dargestellt.

4.1.6. Statistische Auswertung

Unterschiede in der intestinalen Hefebesiedlung zwischen den beiden Anlagen wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mittels der Software „Statistica 6.0“ (StatSoft, Tulsa, USA) verglichen. Die Darmabschnitte galten als abhängige Variablen. Da die Anzahl der abgesetzten und nicht abgesetzten Tiere ungleich war, wurde ein post hoc-Test, Tukey's – HSD (Tukey's Honestly Significant Difference) für ungleiche n angewendet. Als statistisch signifikante Differenz wurde $p < 0,05$ definiert. Für die Beschreibung der Biodiversität innerhalb der Hefepopulation können unterschiedliche statistische Methoden angewandt werden (Magurran, 2004). Die Berechnung der unten beschriebenen Indizes und die Erstellung der Diagramme erfolgten unter Nutzung von Microsoft® Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und der bei Magurran dargestellten Beispiele und Verfahrensweisen.

Q-Statistik (Kempton und Taylor, 1976; 1978) wurde in der vorliegenden Untersuchung als Index zur Bewertung der Biodiversität verwendet. Dieser Parameter basiert auf der kumulativen Darstellung der Verteilung der Abundanz (die Anzahl der Individuen einer Art). Die Beschreibung der Biodiversität wird durch die Berechnung des Interquartilsabstandes erreicht, wobei weder dominante noch selten vorkommende Spezies berücksichtigt werden.

Der Parameter Q-Statistik kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$Q = \frac{\frac{1}{2}n_{R1} + \sum_{R_1+1}^{R_2-1} n_r + \frac{1}{2}n_{R2}}{\ln(R2 / R1)}$$

⁹ Ein gewurzelter phylogenetischer Baum ist ein gerichteter Baum mit einem einzelnen Knoten, der dem nächsten gemeinsamen Vorfahren aller Arten im Baum entspricht.

¹⁰ Ein ungewurzelter phylogenetischer Baum hat keinen ausgezeichneten nächsten gemeinsamen Vorfahren und stellt eine Verwandtschaftsnähe oder -ferne zwischen den einzelnen Arten dar.

Dabei ist n_r die Gesamtzahl der Spezies in einem Ökosystem R; R_1 und R_2 sind 25 %- und 75 %-Quantile, n_{R1} bezeichnet die Zahl der Individuen in der Klasse R_1 , n_{R2} bezeichnet die Zahl der Individuen in der Klasse R_2 .

Die Bestimmung der R_1 - und R_2 -Quantile ergibt sich durch:

$$\sum_1^{R_1-1} n_r < \frac{1}{4} S \leq \sum_1^{R_1} n_r \quad \text{und} \quad \sum_1^{R_2-1} n_r < \frac{3}{4} S \leq \sum_1^{R_2} n_r$$

Dabei ist S die Gesamtzahl der Spezies.

Außerdem wurden zur Beurteilung der Hefepopulation die speziell zur Beschreibung der Biodiversität entwickelten Parameter - wie der nicht parametrische Simpson-Index (D) und der Shannon-Index (H') - verwendet.

Der Simpson-Index beschreibt die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig ausgewählte Individuen der gleichen Art angehören. Je höher die Werte von D sind, umso beträchtlicher ist die Diversität der untersuchten Individuen.

Folgende Formel wird für die Berechnung des Simpson-Indexes angewendet:

$$D = \sum \left(\frac{n_i [n_i - 1]}{N [N - 1]} \right)$$

Dabei ist n_i die Anzahl der Individuen einer Art i und N die Gesamtzahl der Individuen. Anschließend ist der Simpson Diversität Index durch den reziproken Wert von D zu berechnen.

Reziproker Simpson-Index = $1/D$

Im Modell des Simpson-Indexes werden die dominanten Spezies stärker, die vereinzelt vorkommende Individuen dagegen gar nicht berücksichtigt. Im Vergleich dazu wird bei der Berechnung des Shannon-Indexes (H') sowohl die Anzahl unterschiedlicher Arten als auch die Individuenzahl beachtet. Der H'-Wert steigt mit

zunehmender Artenzahl und zunehmender Gleichverteilung der relativen Individuenzahlen.

$$H' = -\sum p_i \ln p_i$$

Dabei ist p_i die Proportion (n_i/N) der Individuenzahl (n_i) zur Gesamtindividuenzahl (N).

Mittels dieser Diversitätsindizes lässt sich keine Aussage darüber machen, ob der Wert auf einer höheren Artenzahl oder auf einer gleichmäßigen Verteilung der Individuen bei niedriger Artenzahl beruht. Um die Gleichverteilung der Individuen (Evenness) zu bestimmen, wird deshalb der Simpson-Index Evenness (E) und der Shannon-Index Evenness (J') durch das Verhältnis der mit einem Diversitätsindex ermittelten Diversität zu der Gesamtzahl der Spezies (S) berechnet.

$$E_{1/D} = \frac{(1/D)}{S} \text{ bzw. } J' = H' / H_{\max} = H' / \ln S$$

Die Evenness-Werte rangieren im Bereich von 0 bis 1, wobei die kleineren Werte auf eine geringere Gleichverteilung hinweisen, während die höheren Werte einer gleichen Häufigkeit der Individuen in einem Ökosystem entsprechen.

4.1.7. Morphologische Ausprägung definierter Hefekulturen

Um Einzelkolonien zu bekommen, wurden unter Nutzung einer Impfföse die Hefe-Reinkulturen aus den Glycerinkonserven auf SGA-Platten gepunktet. Nach Inkubation (4 – 5 Tage bei 37 °C) wurden die Kolonien bzw. die Kolonieränder mikro- und makroskopisch untersucht. Danach wurden die einzelnen Hefekolonien mit einer Digitalkamera (Nikon COOL PIX 8700) unter Anwendung eines Stativs mit Lichtsystem RB2 (Kaiser Fototechnik GmbH, Buchen, Deutschland) fotografiert. Anschließend wurden die Photos mit Corel PHOTO-PAINT X3 (Corel Corporation, Unterschleißheim, Deutschland) auf einem einheitlichen Hintergrund zusammengestellt.

4.2. **Experiment B – Veränderung der Hefepopulation im Kot von Ferkeln vor und nach dem Absetzen**

4.2.1. **Versuchstiere, Fütterung und Haltung**

In diesem Experiment sollte sowohl die Entwicklung der den Darm besiedelnden Hefen, insbesondere der dominanten Spezies, als auch eine mögliche Interaktion mit anderen intestinalen Mikroorganismen untersucht werden. Hinweise zu möglichen Aufgaben und Funktionen der Hefen im GIT von Ferkeln zu finden, war ein weiteres Ziel dieses Experimentes.

So wie im ersten Experiment wurde auch dieser Versuch unter den gleichen Bedingungen der zwei zuvor beschriebenen Anlagen - EAS und KF - durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden wieder Ferkel der Deutschen Landrasse gewählt. Von der Geburt bis zum Absetzen wurden die Ferkel bei den Sauen gehalten. Den Ferkeln wurde bis zum Zeitpunkt des Absetzens kein Mischfuttermittel verabreicht. Am 28. LT wurde von jeder Sau die Hälfte des Wurfes abgesetzt. Diese Ferkel erhielten *ad libitum* das handelsübliche Ferkelaufzuchtfutter II „Porcibig“ (Trede & von Pein, Itzehoe, Deutschland). Die anderen Ferkel wurden bis zum 39. LT von der Sau gesäugt und erhielten kein Mischfuttermittel. Die Tiere wurden keinerlei Behandlungen (prophylaktischer oder therapeutischer Arten) mit Antibiotika unterzogen.

Insgesamt wurden 64 Ferkel - in beiden Anlagen 16 abgesetzte Ferkel (ABF) und 16 nicht abgesetzte Ferkel (NAF) - von jeweils 4 Sauen pro Anlage untersucht. Außerdem wurden zusätzlich von jeder Anlage Kotproben von 10 DL-Sauen für die Untersuchungen der Hefebesiedlung mittels Kultivierung verwendet.

4.2.2. **Probennahme und – aufarbeitung**

Am Tag des Absetzens sowie am 33. und 39. LT wurden Kotproben sowohl von allen Ferkeln als auch von den Sauen direkt aus dem After mittels eines Glasstäbchens entnommen. Zusätzlich wurden Kotproben vom Boden der Buchten sowie Proben des Sauen- und Ferkelfutters sowie des Wassers genommen. Gleich nach der Gewinnung wurden die Proben mit Eis gekühlt und für die weiteren Untersuchungen

ins Labor transportiert, wo umgehend mit den auf Kultivierungsmethoden basierenden Untersuchungen begonnen wurde.

4.2.3. Keimzahlbestimmung der Mikroorganismen im Kot

Für die klassischen Untersuchungen wurden die frisch gewonnenen Proben mit Natriumchloridlösung (0,9 %) dezimal verdünnt, das Inokulat in einer Menge von 0,1 ml Verdünnungsflüssigkeit auf zwei Parallelplatten entweder auf festen Nährmedien gleichmäßig verteilt (Oberflächenverfahren) oder in einer Menge von 1,0 ml Keimsuspension in verflüssigtes Medium eingemischt (Plattengussverfahren). Die Kulturen von Enterobakterien, Enterokokken und Hefen wurden im Oberflächenverfahren und von Laktobazillen im Plattengussverfahren angelegt. Die Analyse der Wasser- und Futterproben wurde zur Erfassung von Hefen durchgeführt. Kotproben von Ferkel, Sauen und vom Boden der Buchten wurden auf vier interessierende Keimgruppen mit Hilfe nachfolgender Selektivnährböden von MERCK & VWR (Darmstadt, Deutschland) untersucht. Die Zubereitung der Nährböden erfolgte nach den Vorschriften des Herstellers unter Verwendung von Reinstwasser.

- Enterobakterien: Kristallviolett–Neutralrot–Galle–Glucose –Agar nach MOSSEL, (VRBD)
- Enterokokken: Membranfilter–Enterokokken–Selektivagar nach SLANETZ und BARTLEY, (S+B)
- Laktobazillen: Lactobacillus–Agar nach DE MAN, ROGOSSA und SHARPE, (MRS)
- Hefen: Sabouraud 2 % – Glucose –Agar (SGA)

Enterobakterien wurden ca. einen Tag, Enterokokken ca. drei Tage und Hefen ca. fünf Tage unter aeroben Bedingungen bebrütet. Die Inkubation der Laktobazillen erfolgte anaerob in Anaerobiertöpfen unter Verwendung von Anaerokult® A (Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Inkubationstemperatur für alle Keimgruppen betrug 37 °C. Die Berechnung der Keimzahl wurde wie in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis wurde als lg KBE/g Probe angegeben.

4.2.4. **Statistische Auswertung**

Zur statistischen Analyse wurde die Varianzanalyse (ANOVA, analysis of variance) mittels Software „Statistica 6.0“ (StatSoft, Tulsa, USA) durchgeführt. Dabei wurden die mikrobiellen Gruppen als abhängige Variablen und Anlage, Gruppe (ABF und NAF) und Alter als Hauptfaktoren definiert. Um den Effekt von diesen Faktoren auf Zusammensetzung der gesamten Mikrobiota bei Ferkeln zu ermitteln, wurde eine mehrfaktorielle ANOVA mit anschließendem post hoc-Test (Tukey HSD) verwendet. Der Effekt des Betriebes innerhalb einer mikrobiellen Gruppe bei Sauen wurde mittels einfaktorielle ANOVA untersucht. Als statistisch signifikante Differenz wurde $p < 0,05$ definiert.

4.2.5. **Isolierung und Messung genomischer DNA aus dem Kot**

Das FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben für die Extraktion der genomischen DNA aus den Kotproben verwendet. Die DNA-Konzentration wurde unter Nutzung des Nanodrop ND-1000 Spektralphotometers (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Deutschland) bestimmt und in ng je μ l ausgewiesen.

4.2.6. **Bestimmung der Hefepopulation mittels der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE)**

4.2.6.1. **PCR des eukaryotischen 26S rRNA Gens**

Für die qualitative Charakterisierung der intestinalen Hefen wurden die DNA-Isolate anhand der PCR-DGGE-Fingerprinting-Methode analysiert. Zur Amplifikation der eukaryotischen 26S rDNA-Fragmente D1 & D2 Domänen wurde eine Nested (verschachtelte)-PCR angewendet. Die in Abschnitt 4.1.4.2 beschriebenen Primer NL1 und NL4 wurden für die erste PCR-Amplifikation benutzt. Anschließend wurden die Produkte als Template für die nächste Amplifikation mit den Primern NL1-GC und LS2 eingesetzt. Außerdem wurde zum Vergleich eine Standard-PCR (einstufig) mit den Primern NL1-GC und LS2 (Tab. 5) durchgeführt (Cocolin *et al.*, 2000).

Tab. 5: Primer für PCR in Experiment B

Name	Sequenz 5' – 3'
NL1–GC f (54)	<u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG</u> GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG
LS2 r (20)	ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC

GC–Klammer ist fett markiert und unterstrichen.

Die DNA–Isolate der aus beiden Anlagen stammenden Proben wurden nach dem gleichen Prinzip behandelt. Die Template–DNA von direkt aus dem After entnommenen Kotproben sowie Kotproben vom Boden wurden auf 15 ng/µl mit *aqua bidest.* verdünnt. Die Verdünnungen der Proben vom Kot der Ferkel wurden zu einer Mischprobe zusammengefasst, so dass pro Gruppe (abgesetzte und nicht abgesetzte Ferkel) und Termin (28., 33. und 39. LT) vier DNA–Mischungen entstanden. Jeder Mix bestand aus den DNA–Isolaten von vier Ferkeln, die aus den vier unterschiedlichen Würfen stammten. Die DNA–Verdünnungen der Sauenkotproben von drei Terminen wurden in einer Mischprobe zusammengefasst. Die DNA–Gemische der Kotproben vom Boden wurden nach dem gleichen Prinzip hergestellt. Zur Durchführung der PCR wurde der Q–BioTaq CORE Kit (siehe Abschnitt 4.1.4.2) verwendet. Der PCR–Reaktionsmix für die zweite Amplifikation der Nested–PCR mit einem Gesamtvolumen von 25 µl (24 µl Mastermix + 1 µl Template–DNA) war folgendermaßen zusammengesetzt:

- Inkubationspuffer: 2,49 µl
- Primer Forward (10 mM): 0,49 µl
- Primer Reverse (10 mM): 0,49 µl
- dNTP's (10 mM jeder): 0,49 µl
- Taq–Polymerase (5 U/µl): 0,125 µl
- PCR–*aqua bidest.*: 19,92 µl

Um die Ausbeute der PCR–Produkte zu erhöhen, wurde bei der ersten Amplifikation sowie bei der Durchführung der einstufigen PCR die DNA–Menge auf 4 µl (60 ng)

erhöht und dementsprechend die Wassermenge reduziert, so dass sich in der Summe 25 µl Reaktionsmix ergaben.

Die PCR (24 µl Mastermix + 1 µl DNA) wurde mit den Primern NL1–GC und LS2 und mit 10 ng/µl Template–DNA unter Nutzung der Programme (Tab. 6) mit einem MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Nach der PCR wurden die Produkte auf Agarosegel überprüft (siehe Abschnitt 4.1.4.3) und bei –20 °C gelagert. Vor der DGGE–Analyse wurden die PCR–Produkte für 1 – 2 Stunden bei + 4 °C gelagert.

Tab. 6: PCR-Programme in Experiment B

Phase	PCR mit NL1 & NL4			PCR mit NL1–GC & LS2		
	Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1	95 °C	3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	35	95 °C	30 sec	35
Annealing	59 °C	30 sec		56 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec		72 °C	30 sec	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1	72 °C	7 min	1

4.2.6.2. Vorbereitung der DGGE–Apparatur und Herstellung des Polyacrylamid–Gels

Zur Durchführung der DGGE wurde das DCode Universal Mutation System von Bio–Rad (USA) angewendet (Abb. 7). Das System erlaubt die gleichzeitige Analyse von bis zu drei Gelen. Zunächst wurde der Puffertank mit Elektrophorese–Puffer (0,5 x TAE) aufgefüllt und zum Aufwärmen des Puffers die DGGE–Apparatur auf 65 °C eingestellt. Eine aus zwei Glasplatten, zwei Abstandhaltern (Spacer) und einem Kamm bestehende Gel–Kassette wurde für die Herstellung des Gels vorbereitet (Abb. 7). Bei Bedarf kann eine Gel–Kassette auch für Doppelgele benutzt werden.

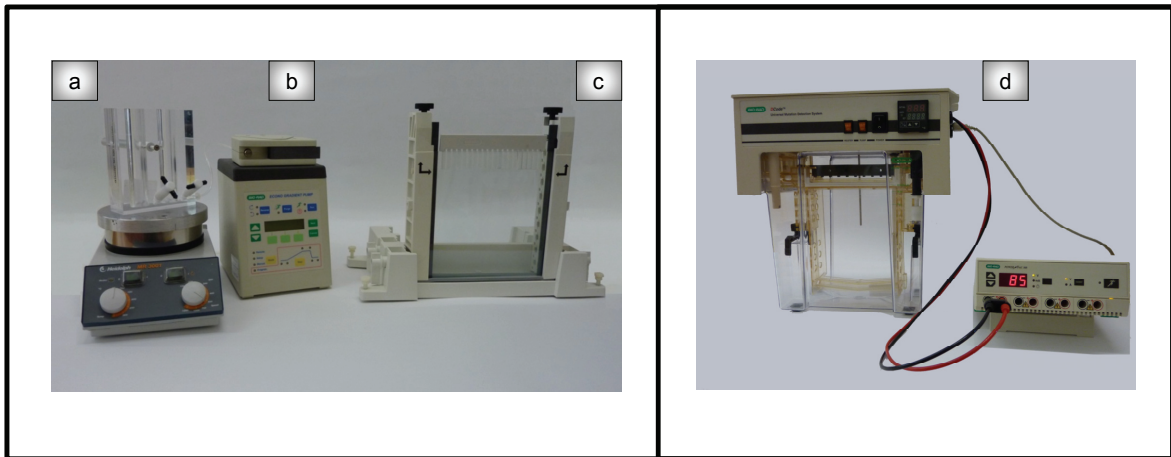


Abb. 7: Gradientenmischer (a), Econo Gradientenpumpe (b), Gel-Kassette mit einem Kamm (c) und das DCode Universal Mutation System (d)

Die Materialien wurden zuvor mit *aqua dest.* gereinigt und mit Ethanol (99,9 %) abgewischt. Außerdem wurden die Kammern des Gradientenmischers Hoefer SG100 (Amersham Biosciences, München, Deutschland) mit Reinstwasser gespült und anschließend getrocknet. Zur Herstellung eines 8 %-igen Polyacrylamid-Gels wurden die Gradienten-Lösungen (Tab. 7) hergestellt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Polyacrylamid-Lösungen (Herstellung siehe Tab. A 7) wurden kurz vor dem Gießen mit dem Polymerisationskatalysator N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und dem Polymerisationsinitiator Ammoniumperoxodisulfat (APS) versetzt. Direkt danach wurde das Gel mit einem isovertikalen Gradienten von 30 % bis 60 % Harnstoff mit Hilfe des Gradientenmischers und einer Econo Gradientenpumpe (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) hergestellt (Abb. 7).

Tab. 7: Zusammensetzung der denaturierenden Gradienten

Harnstoff-Konzentration %	Polyacrilamid-Lösungen [ml]		Polymerisationsstoffe [µl]	
	0 %	100 %	TEMED	10 % APS
0	9,0	–	13	50
30	9,1	3,9	13	50
60	5,2	7,8	13	50

TEMED = N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, APS = Ammoniumperoxodisulfat

Das Gel wurde mit der 0 %-igen Gradienten-Lösung, die als Sammelgel diente, überschichtet. Anschließend wurde je nach Probenzahl ein Kamm mit 20 oder 25 Zähnen ins Gel eingeführt und zur Polymerisierung etwa 1,5 Stunden stehen gelassen. Auf diese Weise entstanden 20 bzw. 25 Taschen, die im weiteren Verlauf mit den Proben beladen wurden.

4.2.6.3. **Beladung des Gels und Durchführung der Elektrophorese**

Vor dem Beladen des Gels wurde der Kamm aus den polymerisierten Gelen entfernt, zwei Gel-Kassetten mit einem Kassetten-Träger zusammengesetzt und in den Puffertank mit vorgewärmtem Puffer (65 °C) gestellt. 10 µl der PCR-Produkte wurden mit 4 µl 5 x DNA Lader-Puffer (Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland) versetzt, mittels einer Pipette gründlich gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Um die Wanderung der Fragmente durch das Sammelgel zu beschleunigen, wurde nach dem Beladen das DCode System 10 min bei 200 V in Betrieb genommen. Danach erfolgte die Elektrophorese über 16 Stunden bei einer konstanten Spannung von 85 V und einer Temperatur von 60 °C.

4.2.6.4. **Färbung und photographische Aufnahme der Gele**

Zur Auswertung des Gels wurde eine Farblösung (200 ml 1 x TAE Puffer + 25 µl SYBR-Gold (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)) in einer lichtgeschützten Box vorbereitet. Die Farblösung kann bis zu drei Mal benutzt werden, wobei nach jeder Verwendung die Inkubationszeit um 10 min zu erhöhen ist. Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gel-Kassetten auseinander gebaut und die Gele zur Färbung vorsichtig in die Box mit frischer Farblösung gelegt und 10 min in einem Schüttelinkubator 1000 (Heidolph, Düsseldorf, Deutschland) bei Raumtemperatur gelassen. Dadurch verband sich das SYBR-Gold mit den DNA-Fragmenten, welche nun unter UV-Licht fluoreszierten. Die Gele wurden mit dem Geldokumentationssystem AlphaDigiDoc RT (siehe Abschnitt 4.1.4.3) fotografiert. Die interessierenden Banden wurden nach der Aufnahme mittels steriler Kanülen ausgeschnitten und in Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluß erfolgte eine Zugabe von 50 µl *aqua bidest.* Die DNA der Banden wurde mit den Primern NL1 und LS2, amplifiziert (siehe Abschnitt 4.2.6.1) und danach sequenziert (siehe Abschnitt 4.1.4.4).

5. Ergebnisse

5.1. Experiment A

5.1.1. Identifizierung der Hefen

Bei den 95 Ferkeln, die alle am 39. Lebenstag geschlachtet worden waren, konnten in allen untersuchten Chymusproben insgesamt 173 Hefekolonien isoliert und identifiziert werden. Die meisten Hefekolonien (70,3 %) wurden im Probenmaterial der abgesetzten Ferkel (ABF) gefunden, während nur 27,7 % im Chymus der nicht abgesetzten Ferkel (NAF) isoliert wurden.

Die Identifikation erfolgte über die Sequenzierung der DNA-Fragmente der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA Sequenzen. Stimmten die Sequenzen zu mindestens 97 % mit den in der NCBI Gendatenbank hinterlegten Sequenzen überein, wurden die Stämme als Phylotyp bezeichnet.

Die Untersuchungen zeigten die Existenz von insgesamt 17 Phylotypen (Tab. 8): 15 Phylotypen wurden bei den Ferkeln aus der EAS und 10 Phylotypen bei den Ferkeln aus der KF nachgewiesen. Ungeachtet der höheren Hefevielfalt dominierten bei den EAS-Tieren nur zwei Phylotypen (*Kazachstania slooffiae* und *Candida glabrata*), während bei den Ferkeln der KF trotz geringerer Hefevielfalt hauptsächlich drei Phylotypen (*K. slooffiae*, *Galactomyces geotrichum* und *Candida catenulata*) auftraten.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass *K. slooffiae* in beiden Anlagen die am meisten vorhandene Hefeart war. Dabei wurde jedoch ein Unterschied augenscheinlich, der darin bestand, dass diese Spezies im Darm der EAS-Ferkel sowohl bei NAF als auch bei ABF in gleicher Anzahl gefunden wurde, dagegen im Darm der KF-Tiere nur bei den ABF vorhanden war. Wie *K. slooffiae* wurden drei weitere Hefen (*G. geotrichum*, *P. fermentans* und *T. montevideense*) im Chymus der EAS-Ferkel, die bei der Sau verblieben sind, isoliert. Des Weiteren wurde in der gleichen Gruppe der Ferkel der KF fünf Hefen (*G. geotrichum*, *C. catenulata*, *C. glabrata*, *T. asahii* und *T. coremiiforme*) nachgewiesen. Zwei dieser Hefearten (*G. geotrichum* und *C. catenulata*) wurden auch bei ABF ähnlich häufig ermittelt.

Eine weitere Beobachtung hinsichtlich der Hefearten im Chymus der Ferkel aus den beiden Anlagen war die, dass 7 Phylotypen (*P. fermentans*, *C. tropicalis*, *C.*

Ergebnisse

oleophila, *C. parapsilosis*, *P. guilliermondii*, *R. mucilaginosa* und *T. montevidense*) nur bei Tieren der EAS und zwei Phylotypen (*C. silvae* und *P. farinosa*) nur bei KF-Tieren isoliert wurden.

Tab. 8: Aus dem Gastrointestinaltrakt von abgesetzten (ABF) und nicht abgesetzten (NAF) Ferkeln (39 LT.) isolierte Hefephylotypen¹

Phylotypen (S=17)	EAS (S=15)			KF (S=10)			Gesamt (n=95)
	NAF (n=9)	ABF (n=35)	Gesamt (n=44)	NAF (n=18)	ABF (n=33)	Gesamt (n=51)	
<i>Kazachstania slooffiae</i>	10	10	20	0	26	26	46
<i>Galactomyces geotrichum</i>	4	0	4	16	14	30	34
<i>Candida catenulata</i>	0	3	3	9	9	18	21
<i>Candida glabrata</i>	0	18	18	1	0	1	19
<i>Trichosporon asahii</i>	0	6	6	2	4	6	12
<i>Issatchenkia orientalis</i>	0	9	9	0	1	1	10
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	0	2	2	1	5	6	8
<i>Pichia fermentans</i>	4	3	7	0	0	0	7
<i>Candida tropicalis</i>	0	5	5	0	0	0	5
<i>Pichia anomala</i>	0	3	3	0	1	1	4
<i>Candida oleophila</i>	0	1	1	0	0	0	1
<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	1	0	0	0	1
<i>Candida silvae</i>	0	0	0	0	1	1	1
<i>Pichia farinosa</i>	0	0	0	0	1	1	1
<i>Pichia guilliermondii</i>	0	1	1	0	0	0	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	1	1	0	0	0	1
<i>Trichosporon montevidense</i>	1	0	1	0	0	0	1
Insgesamt	19	63	82	29	62	91	173

¹ Die Identifikation erfolgte durch die Sequenzierung der 26S rDNA der D1 & D2 Domänen und Vergleich mit der NCBI Gen – Datenbank. Minimale Übereinstimmung der Sequenzen zur Identifikation war 97 %. EAS – Experimentalanlage Schwein; KF – kommerzielle Farm; S – Anzahl der Phylotypen; n – Anzahl der Tieren; LT - Lebenstag.

5.1.2. Phylogenetische Analyse

Um die evolutionäre Verwandtschaft der im Schweinedarm vorkommenden Hefearten zu untersuchen, wurden alle 173 Sequenzen der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA mit Hilfe der Software „Geneious 3.0“ analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Sequenzen einer Phylotypgruppe einen separaten Cluster bilden. Um eine bessere und kompakte Darstellung des gesamten phylogenetischen Baumes (Abb. 8) zu ermöglichen, wurde deshalb von jeder Gruppe eine Sequenz ausgewählt. Darüber hinaus wurden die Referenzsequenzen der NCBI-Gen-Datenbank, die nähere Ähnlichkeit mit unseren Sequenzen aufwiesen, in den Baum integriert.

Diese Verfahrensweise bewirkte, dass sich die Topologie des phylogenetisch gewurzelten Baumes (Abb. 8) in zwei große Cluster unterteilte. Um einen Überblick über die Verwandtschaftsbeziehungen der untersuchten Mikroorganismen zu bekommen, wurde eine taxonomische Einordnung der Hefen vorgenommen. Dabei ergab die Klassifizierung, dass die im Cluster I zugeordneten Phylotypen zu den Hefen der Abteilung *Ascomycota* (Schlauchpilze) gezählt werden. Die anderen Hefe-Phylotypen, die im Cluster II zusammengefügt wurden, sind der Abteilung *Basidiomycota* (Basidienpilze) zuzuordnen.

Fast alle von uns sequenzierten DNA-Fragmente zeigten eine hohe Affinität zur entsprechenden Referenzsequenz. Dennoch erhielten zwei Phylotypen (EU445378 / *C. oleophila* (AF178051) und EU445382 / *C. tropicalis* (EU293420)) im phylogenetischen Baum (Abb. 8) im Vergleich zur ursprünglichen Identifikation eine andere Position.

Des Weiteren wurden die Phylotypen von *Kazachstania slooffiae* von beiden Anlagen auf mögliche phylogenetische Unterschiede in den D1 & D2 Regionen der 26S rDNA untersucht. Dabei wurde ersichtlich, dass sich bis auf zwei Sequenzen (EU445422 und EU445429) im Baum (Abb. 9) zwei deutlich getrennte anlagenspezifische Cluster bildeten.

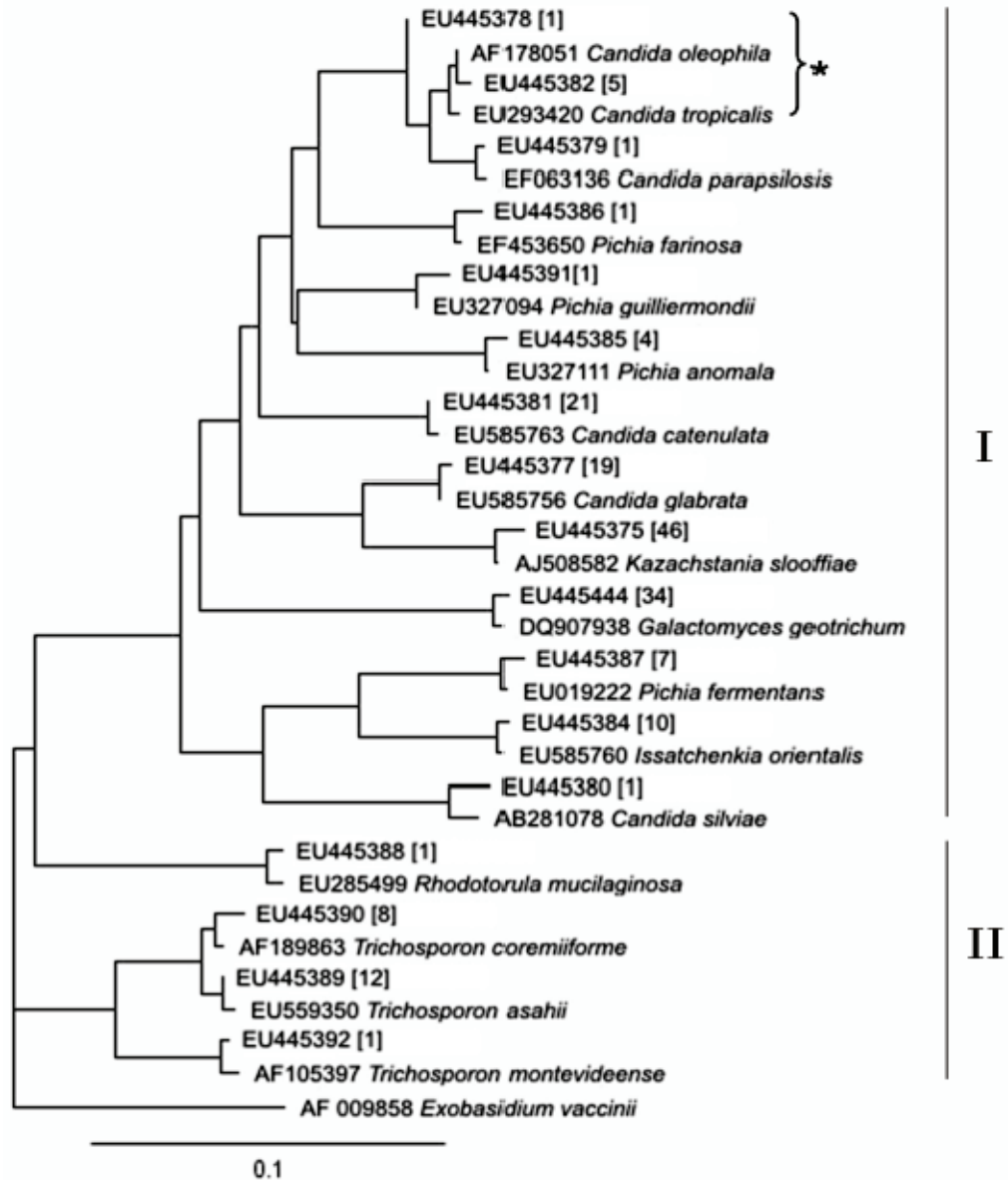


Abb. 8: Gewurzelter phylogenetischer Neighbor-Joining-Baum der Sequenzen der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA von aus dem Gastrointestinaltrakt der Ferkel isolierten Hefen und der Referenzsequenzen aus der NCBI Gen-datenbank. In eckigen Klammern ist die Anzahl der Fragmente aus eigener Studie dargestellt, die mit den jeweiligen NCBI-Sequenzen korrespondieren. * Die Sequenz EU445378 zeigte nähere Ähnlichkeit zu *Candida oleophila* (AF178051), während EU445382 der *Candida tropicalis* (EU293420) ähnelte. Die Sequenz von *Exobasidium vaccinii* wurde aus der Gendaten-bank als Außengruppe gewählt. Evolutions Distanz Modell: Tamura-Nei, Bootstrap ≥ 50 %.

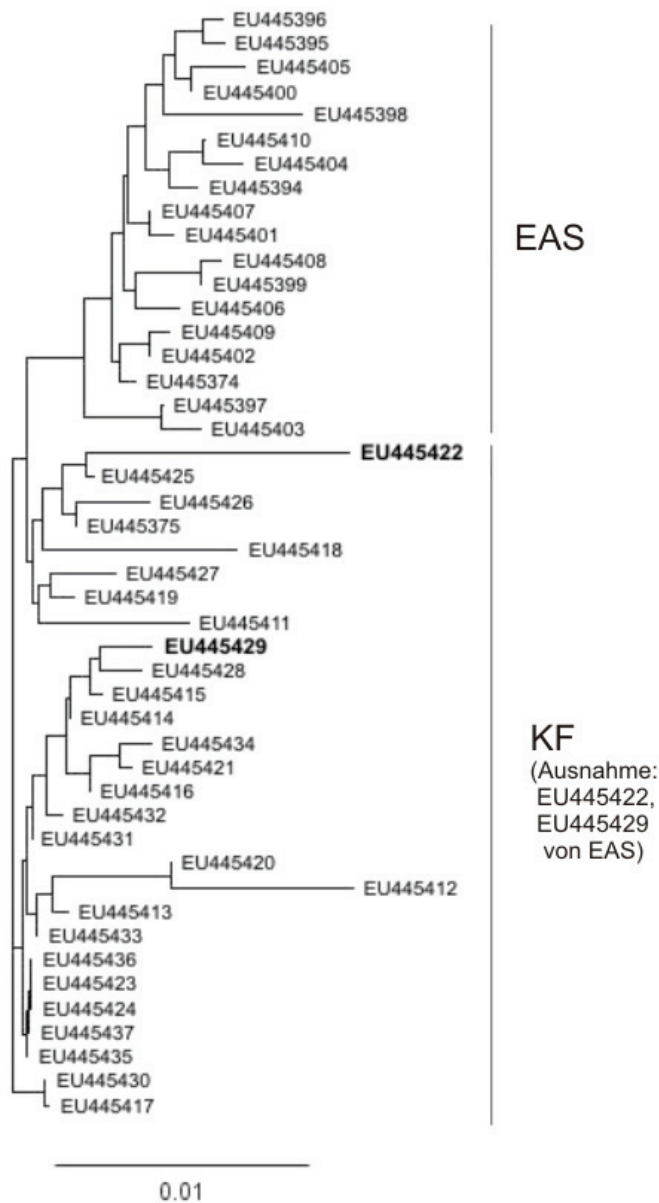


Abb. 9: Neighbor-Joining phylogenetischer Baum der *Kazachstania slooffiae* Sequenzen der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA. Die Hefen wurden aus dem Gastrointestinaltrakt der Ferkel isoliert. Die Informationen zu den jeweiligen Sequenzen sind unter den angegebenen Accessionsnummern in der Gendatenbank des NCBI zu finden.
(EAS – Experimentalanlage Schwein; KF – kommerzielle Farm. Evolutions Distanz Modell: Tamura-Nei, Bootstrap ≥ 50 %)

5.1.3. Morphologische Ausprägung

Da viele Hefen eine ähnliche Koloniemorphologie auf den eingesetzten Nährmedien ausbilden, lassen sie sich sehr schwer differenzieren. Die Verwendung molekularbiologischer Methoden erlaubt die genaue Identifizierung der Hefen. Deswegen wurden in den vorliegenden Untersuchungen für die Identifikation nicht die morphologischen Merkmale der auf Sabouraud–Glucose –Agar (SGA) kultivierten Hefen berücksichtigt, sondern die Sequenzierung der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA.

Die Kolonien waren öfters durch unterschiedliche Morphologie und Farbe (Abb. 10), wie z. B. rote Kolonien bei *Rhodotorula mucilaginosa*, ausgeprägt. *Candida* spp. bildeten auf Platten für diese Gattung typische glatte, runde oder ovale, weiße bis cremefarbene Kolonien. Bei den *Trichosporon* spp. konnten ockerfarbene bzw. braune, glatte oder faltige und matt bis glänzende Kolonien beobachtet werden. Flauchige weiße, runde und konvexe Kolonien wurden von *Galactomyces geotrichum* gebildet. Im Gegensatz zu den anderen Spezies sind die *Geotrichum*-Kolonien durch eine sehr feste Konsistenz und ein langsames Wachstum bei 37 °C gekennzeichnet. Jedoch konnte auch beobachtet werden, dass diese Hefe bereits bei Raumtemperatur (ca. 25 °C) wuchs. Die in beiden Anlagen am häufigsten gefundene *Kazachstania slooffiae* bildete zwei unterschiedliche Koloniemorphologien aus: entweder cremefarbene sternartige mit Strahlen oder runde, in der Mitte geteilte ovale, glänzende ohne Strahlen. Ein gutes Wachstum bei 37 °C wurde für *K. slooffiae* ermittelt, während bei niedriger Temperatur (ca. 25 °C) keine Entwicklung der Kolonien nachgewiesen wurde.



Abb. 10: Hefekolonien, die aus dem Ferkeldarm isoliert und 4 Tage bei 37 °C auf SGA-Platten inkubiert wurden. Die Identifizierung beruht auf der Sequenzierung der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA:

(a, b) *Kazachstania slooffiae* KF, (c, d) *Kazachstania slooffiae* EAS,
 (e) *Rhodotorula mucilaginosa*, (f) *Candida glabrata*, (g) *Galactomyces geotrichum*, (h) *Issatchenkia orientalis*, (i) *Trichosporon montevidense*,
 (j) *Candida tropicalis*, (k) *Pichia guilliermondii*, (l) *Pichia anomala*,
 (m) *Trichosporon asahii*, (n) *Trichosporon coremiiforme*, (o) *Pichia farinose*, (p) *Pichia fermentans*

5.1.4. Kultivierungsabhängige Mikrobiologie

Pilze werden nach den technischen Regeln für biologische Arbeitsstoffe (TRBA) in Risikogruppen eingestuft. Die Pilze, die beim Menschen Infektionskrankheiten verursachen können, sind den Risikogruppen 2 bis 4 zugeordnet. Nach TRBA sind

zwei in der Studie isolierte Hefearten (*Candida tropicalis*, *Trichosporon asahii*) in die Gruppe 2 eingestuft. Deswegen wurden diese Spezies aus Sicherheitsgründen nach der Identifizierung für die Untersuchungen auf Basis der Kultivierung nicht weiter verwendet. Außerdem wurden die einzeln nachgewiesenen Spezies mangels Vergleichsmöglichkeiten keinen weiteren Untersuchungen unterzogen.

5.1.4.1. Keimzahlbestimmung der Hefen im Chymus

Für die quantitative Analyse der intestinalen Hefen wurden die Chymusproben mittels klassischer Kultivierung untersucht. Dabei wurden die Hefekeimzahlen von gleichaltrigen (39. LT) abgesetzten und nicht abgesetzten Ferkeln aus beiden Schweineanlagen verglichen und die Ergebnisse in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Hefekeimzahl (lg KBE/g Chymus), isoliert aus dem terminalen (1/3) Ileum, Caecum und Colon von abgesetzten (ABF) und nicht abgesetzten (NAF) Ferkeln (39 LT.)

	ABF		NAF	
	EAS	KF	EAS	KF
Ileum	4,5 ± 1,1 ^{aA}	5,7 ± 0,6 ^{bA}	3,0 ± 0,7 ^{aB}	2,8 ± 1,9 ^{bB}
Caecum	4,7 ± 1,1 ^{aA}	5,9 ± 0,4 ^{bA}	2,5 ± 1,6 ^{aB}	2,1 ± 1,3 ^{bB}
Colon	4,8 ± 1,2 ^{aA}	6,1 ± 0,4 ^{bA}	3,1 ± 1,1 ^{aB}	2,3 ± 1,0 ^{bB}

^{ab} Signifikante Unterschiede zwischen der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF) in den jeweiligen Darmabschnitten, sowie bei ABF oder NAF;

^{AB} Signifikante Unterschiede zwischen ABF und NAF innerhalb jeder Anlage in den jeweiligen Darmabschnitten, entweder EAS oder KF; ($p < 0,05$; Mittelwerte \pm S).

Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$) zwischen Ileum, Caecum und Colon innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe jeder einzelnen Anlage ermittelt. Dennoch konnte ein tendenzielles Ansteigen der Hefeanzahl vom Ileum zum Colon bei abgesetzten Ferkeln der EAS und KF beobachtet werden. Die Hefekeimzahl von KF-ABF ist in allen drei Abschnitten signifikant ($p < 0,001$) höher als die Hefekeimzahl von gleichbehandelten Tieren in der EAS. Bei NAF in der EAS wurden dagegen höhere Keimzahlen als bei den NAF der KF nachgewiesen. Darüber hinaus wurde

ermittelt, dass die Hefekeimzahl von NAF niedriger als die Keimzahl der ABF unabhängig vom Standort war.

5.1.4.2. ID 32 C System

Nach Angaben des Herstellers sind die zu untersuchenden Mikroorganismen bei 29 ± 2 °C zu inkubieren. Um die Stoffwechselaktivitäten der Hefen im Schweinedarm nachvollziehen zu können, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen die Inkubationstemperatur (37 °C) an die Körpertemperatur (39 °C) adaptiert.

Drei dominante Spezies (*K. slooffiae*, n = 5; *C. catenulata*, n = 5 und *G. geotrichum*, n = 5) wurden mit dem System getestet. In Tab. 10 sind die Ergebnisse der Stämme *C. catenulata* und *G. geotrichum* dargestellt.

Tab. 10: Ergebnisse¹ des ID 32C Systemes von *C. catenulata* und *G. geotrichum*

Substrate	<i>Candida catenulata</i>					<i>Galactomyces geotrichum</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
D-Galactose	+	+	+	+	+	–	–	–	+	–
Cycloheximid	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+
N-Acetyl-Glykosamin	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Milchsäure	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–
D-Cellobiose	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–
D-Trehalose	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Kalium 2-KetoGlukonat	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
D-Mannit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	–	+	+	–	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+
Natrium Glykuronat	+	–	+	+	–	–	–	–	+	–
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
Glucosamin	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–

¹ + ist die Verwertung des jeweiligen Substrates, – ist keine Verwertung.

Die *K. slooffiae* Stämme ließen sich nicht mit dem System charakterisieren. Trotz mehrmaliger Untersuchung wurde keine Reaktion nachgewiesen. Alle *G. geotrichum* Stämme wiesen ein ähnliches biochemisches Reaktionsprofil auf, so konnten z. B. alle Stämme D–Mannit, D–Sorbit, Glycerol, D–Xylose, D–Glucose und L–Sorbose verwerten. Die *C. catenulata* Stämme dagegen sind durch ein inhomogenes Reaktionsprofil gekennzeichnet. Fünf Substrate, D–Galactose, D–Mannit, D–Sorbit, D–Glucose und Glucosamin, wurden von allen *C. catenulata* Stämmen assimiliert. Die Verwertung der anderen in der Tab. 10 dargestellten Substrate war je nach Stamm unterschiedlich.

Weiterhin wurde festgestellt, dass vier *G. geotrichum* und drei *C. catenulata* Stämme gegen das Antibiotikum Cycloheximid (Actidion) in der verwendeten Dosis (0,014 mg/Vertiefung) resistent waren. Das Antibiotikum wirkt als Translationshemmer bei eukaryontischen Zellen, was durch die Blockierung der Proteinbiosynthese zur Wachstumshemmung und schließlich zum Tod der Zellen führt. Aufgrund der toxischen Nebenwirkungen wird Cycloheximid nur *in vitro* als fungizides Mittel angewendet.

5.1.4.3. API ZYM

Es wurden zehn *Kazachstania slooffiae*-Stämme aus der eigenen Studie und zwei *K. slooffiae*-Referenzstämme aus der CBS-Kollektion (CBS 4068, Caecum, Pferd, Portugal und CBS 9733, Caecum, Schwein, Portugal) auf die enzymatischen Aktivitäten geprüft. Die zwei Referenzstämme wurden von Kurtzman *et al.* (2005) detailliert beschrieben. Festgestellt werden konnte, dass alle, sowohl die eigenen als auch die Stämme aus der CBS-Kollektion, das gleiche Enzymbildungsvermögen aufwiesen. Von 19 Enzymen wurden 5 als positiv bewertet: Alkalische Phosphatase (2), Esterase (3), Esterase Lipase (4), Leucin Arylamidase (6) und Valin Arylamidase (7). In Klammern sind die jeweiligen Positionen auf dem API ZYM-Streifen angegeben (Abb. 11). Zwei Reaktionen - Alkalische Phosphatase und Leucin Arylamidase - waren besonders stark ausgeprägt.



Abb. 11: Enzymbildungsvermögen der *Kazachstania slooffiae*-Stämmen im API ZYM Streifen nach 4,5 Stunden Inkubation bei 37 °C (Die Positionen von Enzymen und Zusammensetzung sind aus Tab. A 4 ersichtlich)

5.1.4.4. Assimilationstest in Mikrotiterplatten

Von drei Hefespezies - *C. catenulata*, *G. geotrichum* und *K. slooffiae* - wurden jeweils fünf Stämme und ein *K. slooffiae* Stamm aus der CBS-Kollektion (CBS 9733) im Assimilationstest untersucht. Um einen Vergleich zwischen dem ID 32C System und diesem Assimilationstest zu ermöglichen, wurden in beiden Untersuchungen dieselben Stämme verwendet. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte auf der Basis der visuellen Beurteilung (Tab. 11).

Alle untersuchten Hefen haben die D-Glucose verwertet. Während die *K. slooffiae* Stämme nur D-Glucose als einzige der angebotenen C-Quellen verwerteten, waren alle Stämme von *C. catenulata* durch die Verwertung von D-Galactose, D-Glucose, D-Trehalose, D-Xylose, D-Sorbit und D-Mannitol gekennzeichnet. Außerdem konnten drei der *Candida*-Stämme Glycerol assimilieren und vier wuchsen im Medium mit 0,01 % Actidion.

Sechs Substrate (D-Glucose, D-Xylose, L-Sorbose, D-Sorbit, Gluceron und D-Mannitol) wurden von allen *G. geotrichum* Stämmen assimiliert. Ein Wachstum konnte auch in den Medien mit D-Galactose, Ribitol, Actidion 0,1 % und 0,01 % bei drei *G. geotrichum* Stämmen beobachtet werden.

K. slooffiae zeigte gegenüber den anderen Hefen ein sehr schnelles, bereits nach 24 Stunden erkennbares Wachstum. Dagegen konnten eindeutig positive Reaktionen (Trübung) bei *C. catenulata* und *G. geotrichum* erst nach zwei Tagen registriert werden.

Ergebnisse

Tab. 11: Ergebnisse des Assimilationstestes in Mikrotiterplatten basierend auf der visuellen Beurteilung (+ ist die Verwertung des jeweiligen Substrates, - ist keine Verwertung)

Substrate	<i>K. slooffiae</i>						<i>G. geotrichum</i>					<i>C. catenulata</i>				
	*	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Maltose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lösliche Stärke (autoklaviert)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
meso-Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbit	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Galaktitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ribitol	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Ethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citronensäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Milchsäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bernsteinsäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Gluconsäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α-methyl -D-Glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-Glykosamin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hexadecan	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Actidion, 0,1 %	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Actidion, 0,01 %	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
Lösliche Stärke (tyndalisiert)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* CBS 9733 *Kazachstania slooffiae*

5.1.4.5. Fermentationstest

Bei einem Assimilationstest werden die zu untersuchenden Mikroorganismen auf die Wachstumsfähigkeit in einem Medium mit jeweils einer Kohlenstoffverbindung als Energiequelle untersucht. Dabei wird aber nicht das Fermentationsvermögen der Hefen festgestellt.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden acht Hefespezies in diesen Test einbezogen (Tab. 12). *K. slooffiae*, *C. glabrata*, *I. orientalis*, *P. fermentans* und *P. anomala* waren in der Lage, Glucose zu fermentieren. Besonders schnell fand bei allen *K. slooffiae* Stämmen die Fermentation der Glucose (bereits am Folgetag der Beimpfung) statt, während die anderen Hefen erst nach 1,5 bis 2 Tagen eine positive Reaktion zeigten. Keine Fermentation konnte bei *C. catenulata* und *T. coremiiforme* nachgewiesen werden, obwohl ein Wachstum von *C. catenulata* in den Medien mit D-Galactose und D-Glucose und von *T. coremiiforme* in den Medien mit D-Galactose, D-Glucose D-Maltose, D-Lactose, D-Cellobiose und D-Xylose beobachtet wurde. Weder Fermentation noch Wachstum konnte bei *G. geotrichum* festgestellt werden.

Tab. 12: Ergebnisse¹ des Fermentationstestes

Spezies		Substrate											
Anzahl	Bezeichnung	D-Galactose	D-Glucose	D-Saccharose	D-Maltose	D-Lactose	D-Rafinose	D-Trehalose	Inulin	Lösliche Stärke	D-Melibiose	D-Cellobiose	D-Xylose
10	<i>K. slooffiae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>G. geotrichum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>C. catenulata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>C. glabrata</i>	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	<i>I. orientalis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>T. coremiiforme</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>P. fermentans</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>P. anomala</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

¹ + ist die Verwertung des jeweiligen Substrates, - ist keine Verwertung.

5.1.5. Analyse der Biodiversität der intestinalen Hefepopulationen

Von 173 isolierten Hefekulturen wurden nur 38 aus dem Darm der nicht abgesetzten Ferkel von jeder Anlage isoliert. Da die Anzahl der NAF im Vergleich zu den ABF sehr niedrig war, konnte keine statistische Auswertung der Hefe-Diversität zwischen Absetzferkeln und nicht abgesetzten Ferkeln durchgeführt werden. Die Hefestämme wurden zusammengefasst und als Abundanz im jeweiligen intestinalen Ökosystem, entweder Ferkel von der EAS oder von der KF, betrachtet. Somit wurden alle identifizierten 173 Hefekulturen (EAS, 82; KF, 91) für die Bewertung der biologischen Hefenvielfalt im Ferkeldarm verwendet.

Die Gesamtzahl der Hefearten (Spezies Richness) war bei den Ferkeln der EAS höher als bei den Ferkeln der KF (15 vs. 10; Tab. 8). In Abb. 12 ist der Parameter Q-Statistik der kumulativen Anzahl der Hefearten von EAS und KF dargestellt.

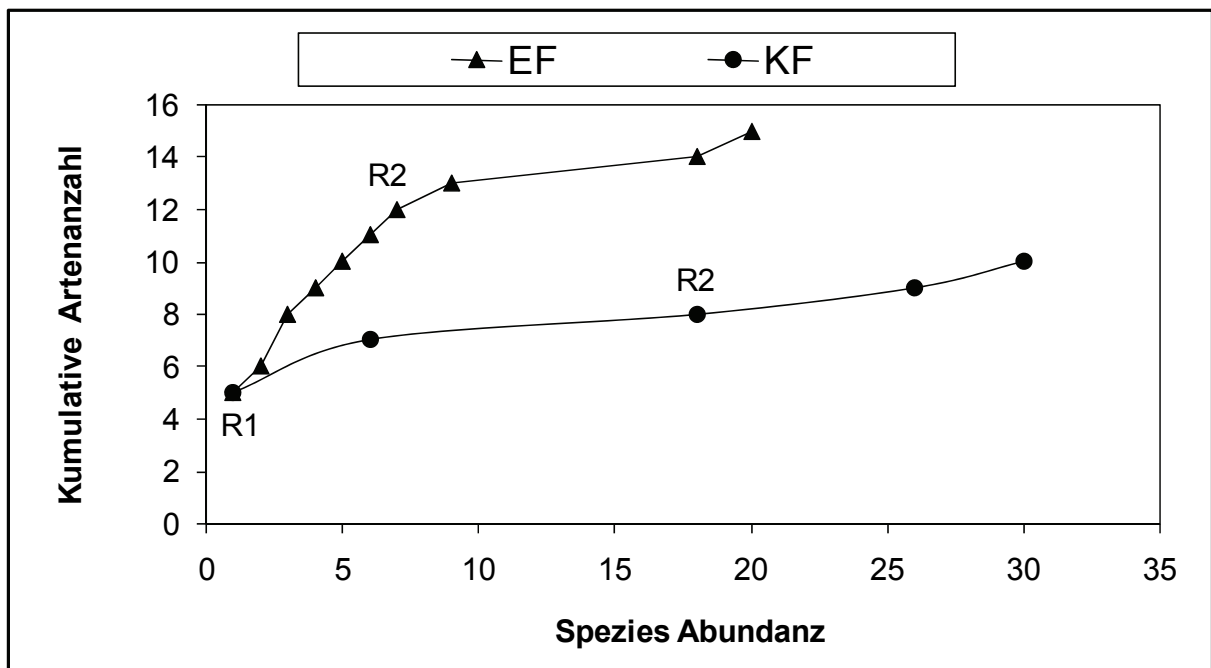


Abb. 12: Kumulative Hefespezies-Kurven von Q-Statistik. Die Biodiversität der kultivierten Hefen im Darm der Ferkel aus der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF), ermittelt durch die Berechnung des Abstandes zwischen den 25 %- (R_1) und 75 % - Quantilen (R_2).

Aus der graphischen Darstellung ist deutlich ersichtlich, dass die beiden Abschnitte der jeweiligen Kurve, welche den Interquartilsabstand markieren, unterschiedliche

Steigungen aufweisen. Des Weiteren war der ermittelte Wert für Q-Statistik der EAS-Ferkel (5,6), bei dessen Berechnung keine dominanten Spezies berücksichtigt werden, zweifach höher als der der KF-Ferkel (2,4). Dominante Spezies werden dagegen bei der Berechnung des Simpson-Index (D) mit berücksichtigt. Jedoch wurden bei der Berechnung des Simpson-Index fünf Hefespezies von jeder Anlage nicht einbezogen, da sie nur einzelne Vertreter der jeweiligen Hefe waren. Wie schon beim Q-Wert beobachtet, fällt auch der D-Wert der KF-Ferkel mit 4,34 niedriger als bei den Ferkeln aus der EAS (7,58) aus (Tab. 13).

Tab. 13: Simpson- und Shannon Indizes der intestinalen Hefepopulation

Indizes	EAS	KF
Simpson Diversität (D)	7,58	4,34
Simpson Evenness (E)	0,51	0,43
Shannon Diversität (H')	2,24	1,65
Shannon Evenness (J')	0,05	0,05

EAS – Experimentalanlage Schwein; KF – kommerzielle Farm

Wird die Diversität der isolierten Hefen auf der Basis des Shannon-Index (H') verglichen, bei dem prinzipiell alle ermittelten Hefearten einbezogen werden, so ist die Diversität bei den Ferkeln der EAS ebenfalls größer als bei den Ferkeln der KF (2,24 vs. 1,65; Tab. 11).

Zur Bestimmung der Gleichverteilung (Evenness) der isolierten Hefearten wurden der Simpson-Index Evenness (E) und der Shannon-Index Evenness (J') berechnet. Die niedrigen E-Werte weisen auf eine ungleiche Verteilung der Hefearten in beiden Anlagen hin. Wie die Tab. 8 zeigt, wurden in der EAS nur 2 und in der KF nur 3 dominante Hefen isoliert. Die anderen nicht dominanten Hefen wurden bei den EAS-Ferkeln 3- bis 9-mal und bei den KF-Ferkeln 6-mal gefunden. Der E-Wert der Hefen von KF-Ferkeln fällt niedriger aus als der bei den EAS-Ferkeln, weil - wie oben beschrieben - bei der Berechnung des Simpson-Indexes die nur einmal vorkommenden Spezies nicht berücksichtigt wurden. Somit wurden von den gefundenen 15 Hefearten der EAS-Ferkel nur 10 bzw. von 10 gefundenen Hefearten der KF-Ferkel nur 5 in die Berechnung einbezogen.

Der J' -Wert der Hefen von beiden Anlagen liegt in dem Versuch mit 0,05 sehr niedrig und verweist damit auf eine noch ungleichmäßigere Verteilung als dies bei der Berechnung mit dem Simpson-Index Evenness (E) schon der Fall war. Dass der J' -Wert gegenüber dem E-Wert so niedrig ausfällt ist weitestgehend darauf zurückzuführen, dass bei dessen Berechnung alle ermittelten Hefearten (in EAS 15 und KF 10), einbezogen werden. Durch das Einbeziehen auch der nur einmal auftretenden Arten ist der Shannon-Index (J') gegenüber seltenen Arten sensibler als der Simpson-Index.

5.2. Experiment B

5.2.1. Keimzahlbestimmung der Mikroorganismen im Kot

Enterobakterien, Enterokokken, Laktobazillen und Hefen wurden mittels klassischer Plattenkultivierung erfasst. Bei der Auswertung der Hefekulturen wurden auf den selektiven SGA-Platten, die das Antibiotikum Chloramphenicol enthielten, resistente Bakterien entdeckt. Die Anzahl aller Bakterien- sowie Hefekolonien wurde als koloniebildende Einheiten pro g Probenmaterial quantifiziert und die Werte als dekadischer Logarithmus angegeben (Tab. 14).

Tab. 14: Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota (lg KBE/g Kot; Mittelwerte + S), isoliert aus dem Kot von abgesetzten (ABF) und nicht abgesetzten Ferkeln (NAF) der Experimentalanlage Schwein (EAS, n = 16 je Gruppe) und der kommerziellen Farm (KF, n = 16 je Gruppe)

	EAS			KF		
	ABF					
	28. LT	33. LT	39. LT	28. LT	33. LT	39. LT
Enterobakterien	8,5 ± 0,5	6,8 ± 1,0 ^A	6,8 ± 0,9	7,8 ± 0,8	7,0 ± 0,8 [#]	6,0 ± 0,6 ^{A#}
Enterokokken	7,6 ± 1,1	4,8 ± 1,2 ^A	3,8 ± 1,2 ^A	6,6 ± 1,3	4,0 ± 2,1 ^A	3,1 ± 2,5 ^A
Laktobazillen	8,7 ± 0,6	8,5 ± 0,5	8,7 ± 0,9 ^A	8,4 ± 0,6	8,1 ± 1,4 [#]	9,3 ± 0,3 ^{A#}
Hefen	1,6 ± 1,7	3,8 ± 1,7 ^A	3,9 ± 2,0 ^{aA}	1,0 ± 1,5	4,4 ± 1,5 ^{A#}	6,6 ± 0,8 ^{bA#}
CARbakt*	5,1 ± 1,3	1,0 ± 1,6 ^{aA}	0,0	6,2 ± 0,8	4,1 ± 2,2 ^b	0,0
	NAF					
	28. LT	33. LT	39. LT	28. LT	33. LT	39. LT
Enterobakterien	8,4 ± 0,5	8,1 ± 0,8 ^B	7,6 ± 1,0	8,3 ± 0,8	7,7 ± 0,6	7,7 ± 0,7 ^B
Enterokokken	7,6 ± 1,3	7,4 ± 1,2 ^B	7,1 ± 1,1 ^B	6,4 ± 1,4	5,9 ± 1,1 ^B	5,9 ± 0,8 ^B
Laktobazillen	8,6 ± 0,4	8,5 ± 0,6	8,1 ± 0,5 ^B	8,4 ± 0,7	8,3 ± 0,4	8,2 ± 0,3 ^B
Hefen	0,7 ± 1,4	2,2 ± 1,6 ^B	2,0 ± 1,8 ^B	0,8 ± 1,5	1,1 ± 1,6 ^B	2,4 ± 1,8 ^B
CARbakt*	4,8 ± 1,8	4,3 ± 2,8 ^B	3,1 ± 2,7 ^a	6,3 ± 2,4	6,1 ± 1,1	5,6 ± 1,9 ^b

^{ab} Signifikante Unterschiede zwischen der EAS und der KF und zwischen ABF und NAF; (p < 0,05).

^{AB} Signifikante Unterschiede zwischen ABF und NAF innerhalb der jeweiligen Anlage, entweder EAS oder KF.

[#] Signifikante Unterschiede zwischen dem 33. und dem 39. LT innerhalb der jeweiligen Anlage.

* Chloramphenicol-resistente Bakterien

Bis zum Tag des Absetzens wurden alle Ferkel in der jeweiligen Anlage unter gleichen Bedingungen gehalten, daher wurden die Werte der intestinalen

mikrobiologischen Besiedlung vom 28. LT in einer Gruppe (entweder EAS oder KF) zusammengefasst und statistisch analysiert. Die Keimzahl der Enterobakterien ($p < 0,01$) und Enterokokken ($p < 0,001$) waren bei den Ferkeln der KF signifikant niedriger als bei den Ferkeln der EAS. Die Kolonienzahl der Chloramphenicol-resistenten Bakterien (CARBakt) war dagegen höher ($p < 0,006$) bei den Tieren aus der KF. Am 28. LT wurden bei den meisten Ferkeln entweder keine oder nur sehr wenige Hefen ($10^1 - 10^2$ KBE/g Kot) nachgewiesen. Beim Vergleich der ABF und der NAF sind in beiden Anlagen deutliche Unterschiede zu sehen (Tab. 14). Es konnten keine bedeutenden Veränderungen in der Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota bei NAF der EAS und der KF bis zum 39. LT festgestellt werden. Im Gegensatz dazu war fünf Tage nach dem Absetzen ein starker Abfall der Kolonienzahl aller Bakterien, außer Laktobazillen, sowohl bei EAS-Ferkel als auch bei KF-Ferkel zu verzeichnen. In EAS blieb der Keimgehalt der Bakterien - mit Ausnahme der CARBakt, die auf den Platten nicht mehr nachweisbar waren, und der Hefen bis zum 39. LT auf etwa gleichem Niveau. Eine andere Situation lag im Darm der KF-Tiere vor. Es wurde eine signifikante Erhöhung der Hefe- ($p < 0,004$) und Laktobazillen-konzentration ($p < 0,001$) festgestellt. Im Gegensatz dazu nahm die Zahl der Enterobakterien ($p < 0,01$) und Enterokokken tendenziell ab. Auch waren keine CARBakt detektierbar.

Um der Frage nachzugehen, inwieweit eventuell eine Hefekontamination mit dem aufgenommenen Futter und Wasser möglich war, wurden von beiden mehrmals Proben gezogen und mittels der Kultivierung analysiert. Auch wurden Proben vom Kot der Muttersauen und von den Böden der Buchten gewonnen und für die Bestimmung der Enterobakterien-, Enterokokken- und Hefenanzahl kultiviert. Bei der Untersuchung der Proben von Wasser, Sauen- und Ferkelfutter wurden keine Hefekolonien gefunden. Damit ist eine Hefekontamination der Ferkel über Wasser und Futter auszuschließen.

Wie aus der Abb. 13 zu erkennen ist, wurden die EAS-Sauen stärker als die Sauen der KF mit Enterobakterien ($p < 0,02$), Enterokokken ($p < 0,03$) und Hefen ($p < 0,001$) besiedelt. Es konnten keine Differenzen zwischen den Anlagen im Laktobazillen-Gehalt des Sauenkotes festgestellt werden. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass im Vergleich zu allen EAS-Sauen nur zwei von vier KF-Sauen mit Hefen kolonisiert waren. Auf den Platten der EAS-Sauen wuchsen nur *Candida*- bzw. *Kazachstania*-artige Kolonien, während von KF-Sauen überwiegend

Geotrichum-artige Kolonien isoliert wurden. Bei den NAF wurden die gleichen Hefekolonien wie bei den Sauen registriert.

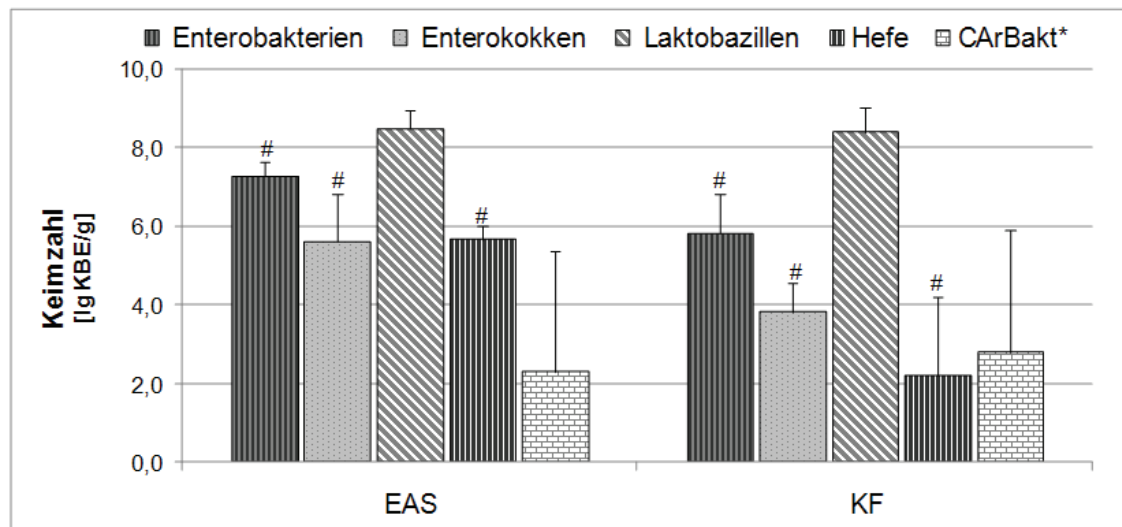


Abb. 13: Keimzahl (lg KBE/g) der Hefen und Bakterien isoliert aus Sauenkot (n = 4, je Anlage) der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF)

Signifikante Unterschiede (p < 0,05) zwischen EAS und KF.

* Chloramphenicol-resistente Bakterien

Zusätzlich zu den Muttersauen wurden von zehn Sauen je Anlage Kotproben direkt aus dem After gewonnen und auf Hefebesiedlungen untersucht. Bei allen KF-Sauen waren keine Hefen nachweisbar. Völlig anders war die Situation bei den EAS-Sauen, die mit einer Hefekonzentration von 10^3 bis 10^5 besiedelt waren. Bei allen Sauen wurden *Candida*- bzw. *Kazachstania*-artige Kolonien isoliert. Die Analyse des Kotes von den Buchtenböden lieferte ähnliche Ergebnisse wie die Analyse des Sauenkotes, d. h. in den Proben aus der KF waren vor allem *Geotrichum*-artige Kolonien vorhanden, während in den EAS-Proben *Candida*- und *Kazachstania* artige Hefen vorkamen.

5.2.2. Identifizierung der Chloramphenicol-resistenten Bakterien

Fünf Kolonien der Chloramphenicol-resistenten Bakterien wurden stichprobenweise isoliert und mit der Sequenzierung des 16S rRNA Gens als *E. coli* Spezies identifiziert. Um die potenzielle Pathogenität dieser Stämme für Ferkel zu

untersuchen, haben wir deren isolierte DNA an das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen geschickt. Dort wurden die DNA-Isolate mit Hilfe der Multiplex-PCR nach Bosworth und Casey (1997) auf die Präsenz unterschiedlicher Gene untersucht, die bei enterotoxischen *E. coli* Stämmen als Virulenzfaktor (wie z. B. *stx2e*, Intimin-, Fimbrien-, und Enterotoxin-Gene) gelten. Drei dieser Stämme wiesen das Gen des hitzestabilen Enterotoxin STb auf.

5.2.3. DGGE

Die PCR-Fragmente der 26S rDNA der identifizierten Hefen aus dem ersten Experiment wurden auf Schmelzverhalten mittels DGGE analysiert. Die verwendeten Primer NL1-GC und LS2 amplifizieren Fragmente mit einer Länge von ca. 250 bp. Die PCR-Fragmente von 13 Hefen wurden im oberen Bereich des Gels mit einem isovertikalen Gradienten von 30 bis 60 % Harnstoff denaturiert (Abb. 14). Ähnliches Laufverhalten wurde für die drei Fragmente von *C. parapsolosis*, *C. oleophila* und *C. tropicalis* ermittelt. Ein Fragment (*Issatchenkia orientalis*) wies eine deutlich höhere Schmelztemperatur auf, d. h. die Denaturierung erfolgte erst im unteren Bereich des Gels. Die Banden für die *K. slooffiae*-Stämme waren unterschiedlich. Während bei den Stämmen der CBS zwei starke Banden festgestellt wurden, war vom *K. slooffiae*-Stamm aus eigener Studie nur eine Bande detektierbar, die im selben Bereich wie die unteren Banden der CBS-Stämme denaturierte.

Nested- und Standard-PCR wurden für die Amplifikation der Hefen direkt nach der Extraktion der DNA aus den Kotproben - ohne deren vorherige Kultivierung - durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.6.1). Dabei wurden keine Unterschiede zwischen den DGGE-Profilen beider PCR-Methoden ermittelt. Lediglich die Ausbeute war bei den Produkten der Nested-PCR höher, wodurch die Banden stärker ausgeprägt waren. Dieser Vorteil wiegt aber nicht den mit der Nested-PCR verbundenen höheren Material- und Zeitaufwand auf, so dass für die weitere Analyse nur die Standard-PCR angewendet wurde.

Die Untersuchung der Isolate der Kotproben von nicht abgesetzten Ferkeln erbrachte zu allen Versuchszeitpunkten das Ergebnis, dass keine PCR-Produkte amplifiziert wurden. Das deutet darauf hin, dass im Kot dieser Tiere keine Hefen vorhanden

waren. Ebenso war es nicht möglich, PCR-Produkte aus den Proben vom Kot der Sauen und vom Boden der Buchten beider Anlagen zu bekommen.

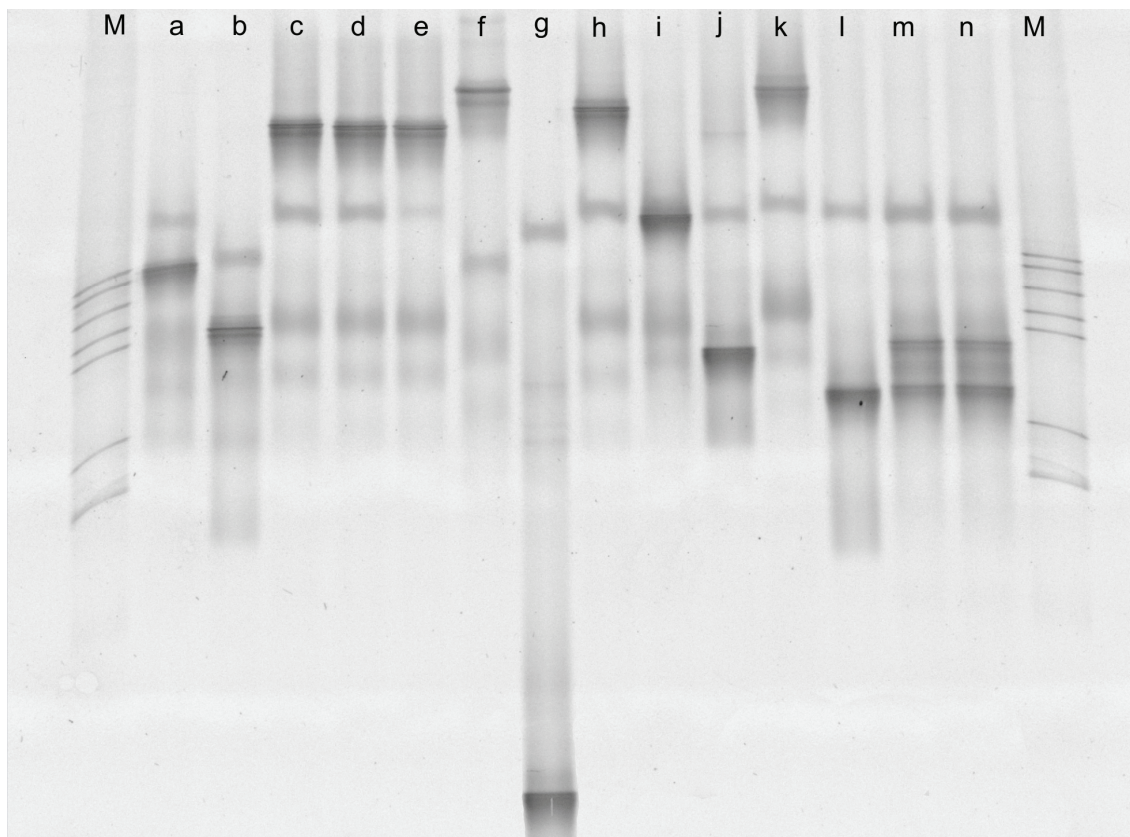


Abb. 14: DGGE-Profile der 26S rDNA PCR-Produkte von auf SGA Medium kultivierten und mittels Sequenzierung identifizierten Hefen (M) Marker, (a) *Candida glabrata*, (b) *Candida catenulata*, (c) *Candida parapsolosis*, (d) *Candida oleophila*, (e) *Candida tropicalis*, (f) *Galactomyces geotrichum*, (g) *Issatchenkia orientalis*, (h) *Pichia anomala*, (i) *Pichia farinose*, (j) *Rhodotorula mucillaginosa*, (k) *Trichosporon montevidense*, (l) *Kazachstania slooffiae*, (m) *Kazachstania slooffiae* (CBS 4068), (n) *Kazachstania slooffiae* (CBS9733)

In Abb. 15 sind die Ergebnisse der DGGE vom Kot der abgesetzten EAS- und KF-Ferkel vom 33. und 39. LT dargestellt. Mit dieser Analyse wurde bei allen Proben eindeutig nur eine Bande nachgewiesen, die anhand der Sequenzierung als *Kazachstania slooffiae* identifiziert wurde. Diese Hefeart wurde bei EAS-Ferkeln in zwei Proben am 33. LT sowie in einer weiteren Probe am 39. LT. nachgewiesen. Dagegen wurde in allen Proben der KF-Ferkel vom 39. LT die für *K. slooffiae* spezifische Bande ermittelt. Nur eine sehr schwache Bande wurde am 33. LT der KF-Ferkel detektiert.

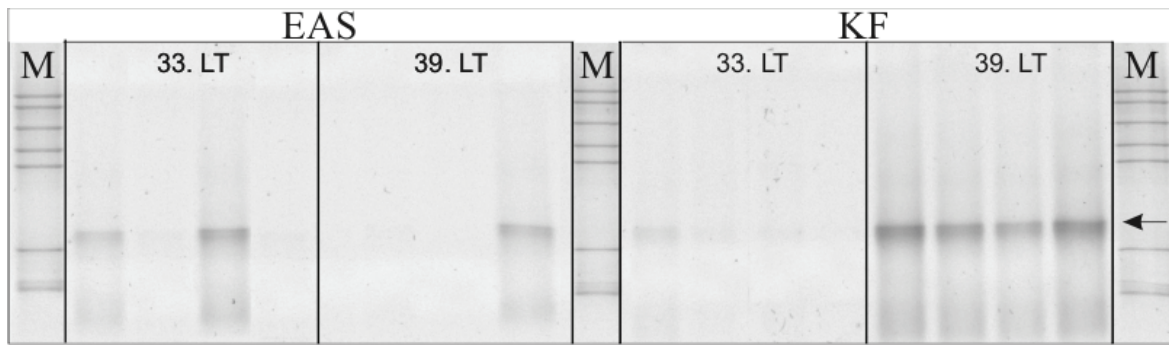


Abb. 15: DGGE–Profile der 26S rDNA PCR–Produkte von Hefen aus dem Kot von abgesetzten Ferkeln (33. und 39. LT) der Experimentalanlage Schwein (EAS) und der kommerziellen Farm (KF)
 Jedes Profil repräsentiert eine DNA–Mischprobe von vier Ferkeln.
 (←) *Kazachstania slooffiae*, die Banden wurden mittels Sequenzierung identifiziert. (M) Marker

6. Diskussion

In der mikrobiologischen Forschung sind die Vor- und Nachteile der herkömmlichen Kultivierungsverfahren und der modernen molekularbiologischen Methoden ein sich wiederholendes Thema der wissenschaftlichen Diskussion. Die rasanten Fortschritte in der Molekularbiologie und Gentechnik ermöglichen die Erforschung der mikrobiologischen Prozesse in verschiedenen ökologischen Nischen. Diese Methoden geben jedoch in einigen Fällen ohne klassische Verfahren keine ausführliche Information, so dass die klassische und molekularbiologische Methode für die Forschung der Mikroorganismen häufig kombiniert angewendet werden. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, die intestinale Hefepopulation beim Ferkel zum Zeitpunkt des Absetzens mittels der kultivierungsabhängigen und der molekularbiologischen Methoden zu untersuchen.

6.1. Beschreibung der Hefevielfalt im GIT von Ferkeln

Ein Vorteil der Kultivierung besteht in der Möglichkeit kultivierbare Mikroorganismen, die im Probenmaterial nur in geringen Konzentrationen auftreten, zu erkennen. Um alle im GIT der Ferkel kultivierbaren Hefen zu erfassen, wurde die Kultivierung mit selektiven Nährböden und nachfolgender Isolierung und Quantifizierung der unterschiedlichen Kolonien durchgeführt. Aus den zuvor (siehe Abschnitt 2.6) beschriebenen Gründen erfolgte die Identifizierung der Hefen mittels der molekularbiologischen Methoden. Im ersten Experiment konnten durch die Sequenzierung der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA die Fragmente von 173 Kulturen 17 Phylotypen zugeordnet werden, die sowohl zur Abteilung *Ascomycota* als auch zur Abteilung *Basidiomycota* gehörten. Die meisten Sequenzen zeigten eine hohe Verwandtschaft mit der *Kazachstania slooffiae* Spezies, die als geschlechtliche Form (teleomorph) von *Candida slooffiae* (anamorph, ungeschlechtliche Form) beschrieben wurde (Kurtzman *et al.*, 2005). Im Vergleich mit früheren Studien (Van Uden *et al.*, 1958; Van Uden und Carmo-Sousa, 1962a; Mehnert und Koch, 1963) stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung darin überein, dass *Kazachstania slooffiae* die bei Schweinen am häufigsten vorkommende Hefeart ist. Interessant war, dass bei den Schweinen in der kommerziellen Farm (KF), also dem Standort, der im Vergleich zur Experimentalanlage Schwein (EAS) die schlechteren

hygienischen Bedingungen und die höhere bakterielle Belastung hatte (Janczyk *et al.*, 2009), *K. slooffiae* häufiger anzutreffen war. Des Weiteren wurde diese Hefe in der KF ausschließlich bei abgesetzten Ferkeln (ABF) gefunden. In der EAS wurde sie dagegen in der gleichen Konzentration bei nicht abgesetzten (NAF) und abgesetzten Ferkeln isoliert. Diese Ergebnisse - das Vorkommen dieser Spezies bei Saugferkeln - würden jedoch der Hypothese von Van Uden und Carmo-Sousa (1962a), die über die Abhängigkeit der *K. slooffiae* von auf Getreide basierendem Futter berichteten, widersprechen. Diese Ergebnisse von Experiment A müssen mit Vorsicht betrachtet werden, da sie gegebenenfalls durch die in den Anlagen unterschiedlich gestalteten Buchten bzw. Tröge beeinflusst wurden. Es stellte sich heraus, dass die Ferkel aus der KF prinzipiell keinen Zugang zum Sauenfutter haben konnten, während dies bei den EAS-Ferkeln durch zu niedrige Futtertrogränder möglich war. Daher lässt sich vermuten, dass bei den EAS-Ferkeln die Etablierung bzw. das Wachstum von *K. slooffiae* dadurch beeinflusst wurde, dass sie bereits während der Säugeperiode teilweise von der Sau verstreutes Futter aufgenommen haben. Die niedrigere Anzahl an NAF erschwert den Vergleich zwischen den NAF und den ABF innerhalb eines Betriebes, jedoch nicht zwischen den Schweineanlagen. Es wäre sicher für das Versuchsergebnis besser gewesen, mehr Würfe in die Untersuchungen einzubeziehen. Dies war aber in der EAS aus Kapazitätsgründen, dem Produktionszyklogramm und dem laufenden Zuchtprogramm in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht möglich. In der Zeit der Versuchsdurchführung war es nur möglich, neun Ferkel bei einer Sau zu lassen. Um einen relativen Vergleich zwischen den Anlagen zu ermöglichen, wurde diese geringere Tierzahl trotzdem für die Studie verwendet.

Die insgesamt zweithäufigste isolierte Hefe *Galactomyces geotrichum* wurde bei den Tieren der KF gefunden wobei die Mehrheit dieser Hefeart bei den NAF, sowohl bei den Tieren der KF als auch der EAS, nachgewiesen wurde. Die Fähigkeit dieser Spezies, die in der Milch vorhandenen Nährstoffe verwerten zu können, begünstigt offensichtlich ihr Vorkommen bei Saugferkeln (Valdes-Stauber *et al.*, 1997). *G. geotrichum* wird in verschiedenen Milieus wie Erdboden, Futter, Käse, fermentierte Milchprodukte (Gente *et al.*, 2002; Pottier *et al.*, 2008) und Human-Faeces (Mo *et al.*, 2004) gefunden. Zudem wird diese Hefe als Starterkultur für die Käseproduktion verwendet (Goerges *et al.*, 2008; Pottier *et al.*, 2008). *Candida catenulata*, die im GIT der KF-Ferkel vorhanden ist, wird sehr häufig in Milch und Käse gefunden (Valdes-

Stauber *et al.*, 1997; Lopandic *et al.*, 2006). *C. catenulata* (Radosavljevic *et al.*, 1999) sowie einige andere, in der vorliegenden Untersuchung gefundene Hefen, wie z. B. *C. glabrata*, *C. tropicalis* (Fidel *et al.*, 1999; Fluckiger *et al.*, 2006; Filioti *et al.*, 2007; Ruan und Hsueh, 2009) und *Trichosporon* spp. (Chowdhary *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2005; Girmenia *et al.*, 2005), besitzen das Potential bei Menschen mit einer ausgeprägten Immunschwäche oder einer Langzeittherapie mit Antibiotika schwere Erkrankungen hervorzurufen.

6.2. Statistische Bewertung der Hefevielfalt im GIT der Ferkel

Viele Faktoren können die Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes mit Hefen beeinflussen. Inwieweit der Standort bzw. die hygienischen Bedingungen einen Einfluss auf die intestinalen Hefepopulationen ausüben können, sollte in dieser Studie untersucht werden. Dazu wurden unterschiedliche statistische Modelle genutzt (siehe Abschnitt 4.1.6). Das Q-Statistik-Modell wurde ausgewählt, da bei der Berechnung dieses statistischen Parameters weder dominante noch selten vorkommende Spezies berücksichtigt werden (Kempton und Taylor, 1976; 1978). Der Simpson-Index (D) wichtet die Abundanzen der Spezies stärker als die Speziesanzahl (Magurran, 2004). Bei der Berechnung des Shannon-Indexes (H') wird dagegen sowohl die Anzahl der unterschiedlichen Individuen als auch die Abundanz beachtet (Magurran, 2004). Daher kommen von den Indizes unterschiedliche Ergebnisse zustande, die sich für die bessere Beschreibung der Diversität ergänzen.

Die Vielfalt der isolierten Hefen lag bei den EAS-Ferkeln höher (15 vs. 10 Spezies; Tab. 8) als bei den KF-Ferkeln. Dieser offensichtliche Unterschied wurde sowohl durch die Ergebnisse der Q-Statistik als auch durch die Simpson- und Shannon Indizes bestätigt. Bei den EAS-Ferkeln waren 2 Hefearten (*K. slooffiae* und *C. glabrata*) durch häufiges Vorkommen gekennzeichnet. Die anderen Hefearten wurden dagegen nur selten isoliert. Dagegen wurden bei den Ferkeln aus der KF drei Hefen (*K. slooffiae*, *G. geotrichum* und *C. catenulata*) in einer höheren Abundanz gefunden. Von den 7 anderen Hefearten wurden 5 jedoch nur einmal isoliert. Alle berechneten Indizes weisen Differenzen zwischen den Schweineanlagen auf. Da wir versucht haben, Faktoren wie genetisches Tiermaterial und Futter weitestgehend vergleichbar zu gestalten, unterstreichen die berechneten Parameter, dass die

unterschiedlichen Standortbedingungen Ursache für die Differenzen in der Besiedlung des Darmes mit Hefen sind.

Über den Umgebungseinfluss auf die Entwicklung der bakteriellen intestinalen Mikrobiota von Ferkeln wurde bereits von Janczyk *et al.* (2009), Thompson *et al.* (2008) und Thompson und Holmes (2009) berichtet. Unseres Wissens liegen bis jetzt im internationalen Schrifttum keine mit den vorliegenden Untersuchungen vergleichbare Studien vor, die bei halbverwandten Absetzferkeln bei gleicher Fütterung und Aufstallung an unterschiedlichen Standorten die intestinale Besiedlung mit Hefen untersuchten. Wenn die Population der intestinalen Hefen untersucht werden soll, so muss dies immer im Zusammenhang mit der Umgebung, dem verabreichten Futter sowie anderen beeinflussenden Faktoren geschehen, da diese von entscheidender Bedeutung sein können.

6.3. Phylogenetische Analyse der Hefe-DNA-Sequenzen

Die bahnbrechende Entwicklung der DNA-Sequenzierung eröffnete neue Möglichkeiten für das Verständnis und die Erforschung der genomischen evolutionären Prozesse bei Hefen (Liti und Louis, 2005). Durch die phylogenetische Analyse der verschiedenen Regionen der ribosomalen DNA werden die evolutionären Beziehungen zwischen unterschiedlichen Spezies dokumentiert (Kurtzman und Fell, 1998; Scorzetti *et al.*, 2002), die bei der konventionellen Klassifizierung auf Grund der phänotypischen Variabilität entweder fehlerhaft interpretiert werden oder oft als undifferenzierbar galten (Barnett *et al.*, 1990).

Zur Erstellung der evolutionären Verwandtschaftsbäume wurde in dieser Studie die Neighbor-Joining Methode verwendet. Seit deren Einführung durch Saitou und Nei (1987) fand dieses, auf Distanzanalyse basierende Verfahren eine weit verbreitete Anwendung bei der Berechnung der phylogenetischen Bäume (Bryant, 2005) in der molekularen Systematik der Hefen (Kurtzman und Fell, 1998; Scorzetti *et al.*, 2002). Auch bei der Beschreibung der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen eng verwandten Spezies kam sie erfolgreich zur Anwendung (James *et al.*, 2001; Kurtzman *et al.*, 2005; Wu und Bai, 2005). Infolge der phylogenetischen Analyse der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA wurde ein evolutionärer Verwandtschaftsbaum entwickelt, der die eindeutige Zuordnung der Hefearten in die Abteilungen *Ascomycota* und *Basidiomycota* zeigt. Die überwiegende Mehrheit der intestinalen

Hefearten gehörte, wie bereits bei Gedek (1968), Mehnert und Koch (1963) und Van Uden und Carmo-Sousa (1962a) beschrieben, zur Abteilung *Ascomycota*.

In beiden Schweineanlagen zeigten die Kolonien der dominanten Spezies *K. slooffiae* ähnliche morphologische Merkmale (siehe Abschnitt 5.1.3). Die phylogenetische Analyse der DNA-Sequenzen von *K. slooffiae* ergab das überraschende Ergebnis, dass fast alle DNA-Fragmente dieser Spezies in zwei separate Cluster entsprechend der Herkunft der Ferkel – also der Schweineanlage – unterteilt wurden. Da sowohl das Probenmaterial als auch die Hefekulturen der gleichen Behandlung unterzogen wurden, sind bei der Aufarbeitung entstandene genetische Veränderungen bzw. Mutationen unwahrscheinlich. Somit deuten die beobachteten Variationen auf die Existenz unterschiedlicher Subspezies in den Anlagen hin, die aus der mikrobiellen Anpassung an die jeweiligen Umweltbedingungen und die damit verbundene unterschiedliche Zusammensetzung der intestinalen Mikrobiota resultieren. Die Differenzen in den ökologischen Nischen bzw. die Veränderungen der Umweltbedingungen werden z. B. bei Insekten als wichtiger beeinflussender Faktor der genetischen Variabilität betrachtet (Sgro und Hoffmann, 2004). Ebenso wurden Variationen in der DNA-Sequenz bei der Hefe *S. paradoxus* nachgewiesen, die in unterschiedlichen geographischen Regionen kultiviert und isoliert wurden (Sniegowski *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004).

6.4. Keimzahlbestimmung auf der Basis der Kultivierung

Die beträchtlichen Unterschiede in der Anzahl der untersuchten nicht abgesetzten und abgesetzten Tiere im ersten Experiment komplizieren die aussagekräftige Interpretation der Ergebnisse. Dennoch sind sie ausreichend, um den Hefekeimgehalt innerhalb der verschiedenen Darmabschnitte bei Ferkeln, die auf einer Anlage aufgestellt waren, zu vergleichen. Im Ergebnis der Analyse wurden keine Differenzen in der Hefebesiedlung zwischen den Kompartimenten des Dün- und Dickdarmes nachgewiesen. Deshalb wurde entschieden, im zweiten Experiment die Zusammensetzung der Darmmikrobiota der Ferkel nur in frischen Kotproben zu untersuchen. Außerdem erlaubt die Analyse des Kotes, die zeitliche Entwicklung der intestinalen Mikrobiota bei denselben Tieren zu untersuchen.

Die Gesamtheit der sozialen, psychologischen sowie futter- und umweltbedingten Stressfaktoren während der Absetzperiode ist bei Ferkeln mit drastischen

Veränderungen in der mikrobiellen Zusammensetzung des Darminhaltes verbunden (Lallès *et al.*, 2004). Dass diese Veränderungen nicht mit dem Alter der Tiere im Zusammenhang stehen, zeigen sehr anschaulich die Ergebnisse der vorliegenden Studie an nicht abgesetzten Ferkeln, bei denen keine gravierenden Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota gefunden wurden.

Pieper *et al.* (2008) zeigten in ihren Untersuchungen, dass bereits einen Tag nach dem Absetzen die Konzentration der gesamten Mikrobiota abnimmt. Dies kann auf die Nahrungsumstellung, sowie auf die nach dem Absetzen auftretende, verminderte Futteraufnahme zurückzuführen sein (Lallès *et al.*, 2007). Die intestinalen Mikroorganismen benötigen eine Adaptationszeit bei der Umstellung von leicht verdaulicher Milch zur komplexen, auf Getreide basierenden und damit kohlenhydrat- und rohfaserreicheren Fütterung. Die im Schweinedarm dominanten Laktobakterien passen sich schnell an solche Veränderungen an (Janczyk *et al.*, 2007). So erreichten in den vorliegenden Untersuchungen die Laktobazillen im Darm der Ferkel aus beiden Anlagen fünf Tage nach dem Absetzen in etwa wieder das Ausgangsniveau wie am Tag des Absetzens. Dagegen waren die Konzentrationen der Enterobakterien und Enterokokken zum gleichen Zeitpunkt immer noch bedeutend niedriger (ca. 10 bis 100-fach) als am Tag des Absetzens. Interessant ist, dass mit steigender Futteraufnahme auch die Quantität der Hefen zugenommen hat. Bemerkenswerte Veränderungen sind bei den KF-Ferkeln am 39. LT im Vergleich zu den gleichaltrigen EAS-Tieren festgestellt worden. Während bei den EAS-Ferkeln zwischen dem 33. und 39. LT keine signifikante Differenz beobachtet wurde, waren bei den KF-Tieren signifikante Veränderungen in Form einer deutlich gestiegenen Konzentration an Laktobazillen und Hefen sowie eine verminderte Konzentration an Enterobakterien zu sehen. Die Enterobakterien stellen eine vielfältige und dynamische Gruppe im GIT der Schweine dar, die sowohl unschädliche als auch opportunistisch pathogene Spezies oder Stämme beinhaltet (Schierack *et al.*, 2007). Dabei wird besonders der Spezies *E. coli*, einem Vertreter der Familie der Enterobakterien, mehr Beachtung, unter anderem auch als Bioindikator der antimikrobiellen Resistenz, geschenkt (Sorum und Sunde, 2001; Jiang *et al.*, 2009). In unseren Untersuchungen wurden fünf Kolonien der Chloramphenicol-resistenten Bakterien (CArBakt) isoliert und durch die Sequenzierung des 16S rRNA Gens als *E. coli* Spezies identifiziert. Zur Beurteilung deren Eigenschaften bzw. Aktivitäten im Darm wurden die isolierten CArBakt mit Hilfe der Multiplex-PCR auf die Präsenz der

unterschiedlichen Virulenzgene geprüft. Drei dieser Stämme wiesen das Gen des hitzestabilen Enterotoxins STb auf. Die STb positiven *E. coli*-Stämme verursachen bei Schweinen hauptsächlich die Erkrankung „Colibazilliose“, die mit heftigem Durchfall verbunden ist (Dubreuil, 2008; Taillon *et al.*, 2008). In unserem Experiment wurde bei den Ferkeln jedoch kein Durchfall beobachtet. Bibbal *et al.* (2009) beschrieben bei wachsenden Schweinen, denen Antibiotika auf unterschiedliche Weise verabreicht wurden, eine für Enterobakterien selektive Wirkung, die durch schnelles Auftreten und starke Vermehrung dieser multiresistenten Spezies gekennzeichnet war. Obwohl wir in den vorliegenden Versuchen keine Antibiotika zum Einsatz gebracht haben, fanden wir bei der Kultivierung der Hefen auf Nährböden mit Chloramphenikol CArBakt, wodurch die Präsenz antibiotikaresistenter Spezies im Darm bzw. die Adaptationsfähigkeit der Bakterien an Antibiotika nachgewiesen wird. Das Auftreten der CArBakt sank tendenziell mit steigendem Alter und bereits 11 Tage nach dem Absetzen waren sie nicht mehr vorhanden. Dies ist gleichzeitig auch eine mögliche Erklärung für die Dezimierung der gesamten Enterobakterienpopulation, wobei jedoch die Ursache für das Verschwinden der CArBakt unklar ist. Anfangs schien es, dass die Zunahme des Hefekeimgehaltes die Anzahl der CArBakt beeinflusse. Dem widersprechen spätere Beobachtungen, die bei 39 Tage alten Ferkeln zeigten, dass auch dann keine CArBakt auftraten, wenn keine Hefen mehr gefunden wurden.

Viljoen (2006) berichtet, dass Interaktionen zwischen Hefen und Bakterien sowie Hefen und anderen Pilzen bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts besonders im Brauereiwesen bzw. der Getränkeindustrie untersucht werden. So werden z. B. Wechselbeziehungen zwischen Laktobazillen und Hefen beschrieben, die in der Natur häufig vorkommen und unter anderem bei der Herstellung von Kefir und verschiedenen Käsesorten genutzt werden (Viljoen, 2001; Narvhusa und Gadaga, 2003). Das Wachstum der Laktobakterien kann von Hefen begünstigt werden, indem sie für die Bakterien essentielle Substrate wie Vitamine, Aminosäuren usw. synthetisieren (Viljoen, 2006).

Wie oben bereits beschrieben deuten die vorliegenden Untersuchungen auch einen Zusammenhang bzw. eine Wechselwirkung zwischen intestinalen Laktobazillen und Hefen an. Ein Grund für den nach dem Absetzen beobachteten Anstieg von Laktobazillen und Hefen im GIT der von uns untersuchten KF-Ferkel ist eine mögliche mutualistische Symbiose zwischen den beiden mikrobiellen Gruppen.

Einige Hefearten (z. B. *K. slooffiae*) sind in der Lage, sich in dem saurem Milieu zu vermehren (Gedek, 1968), das in Folge der Stoffwechselaktivität von Laktobakterien entstanden ist (Pieper *et al.*, 2008). Inwieweit die Hefepopulation direkt das Wachstum und die Zusammensetzung der mikrobiellen Besiedlung des Darmes beeinflusst, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig bewiesen werden. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass auch die intestinalen Hefen für die Mikrobiota essentielle Substrate synthetisieren. Die intestinale Mikrobiota ist ein komplexes Ökosystem und jegliche Veränderung im Milieu wirkt sich umgehend auf dessen mikrobielle Zusammensetzung aus. Die in unserem Experiment beobachtete Reduzierung der Enterobakterien und Enterokokken ist wahrscheinlich auf die Zunahme der Laktobakterien und/oder Hefen zurückzuführen.

Weiterhin bleibt die Frage offen, wie es zur Hefekolonisation im Darm von Absetzferkeln kommt. Als mögliche Eintragsquelle der Hefepopulation wurde der Sauenkot und der Kot vom Boden der Buchten, aber auch das Wasser und das Futter der Experimentalanlage Schwein und der kommerziellen Farm analytisch untersucht. Im trockenen Futter sowie auch im Wasser befanden sich keine kultivierbaren Hefen. Die Hefearten, die in der Umwelt einer Schweineanlage existieren, üben bei gesunden Tieren mit einer ausgewogenen Mikrobiota keinen Einfluss aus, da sie meist nur in niedriger Quantität auftreten. Im Grunde genommen ist von allen gefundenen Spezies nur *K. slooffiae* die einzig spezifische für den Schweine-Verdauungstrakt (Van Uden und Carmo-Sousa, 1962a; Mehnert und Koch, 1963). Zur Besiedlung mit der Hefe kommt es offenbar durch den Kontakt der Ferkel mit dem Sauenkot. Erstaunlich ist die verhältnismäßig hohe Hefebesiedlung bei den KF-Ferkeln, obwohl nur bei der Hälfte der vier KF-Muttersauen und bei keiner der zehn zusätzlich untersuchten Sauen Hefen im Kot isoliert wurden. Da die Etablierung der Hefe im Darm erst nach dem Absetzen und der damit verbundenen Futterumstellung auf Getreidemischfutter stattfindet, kann die Besiedlung im Ferkeldarm durch den Kontakt mit dem Kot der Tiere anderer Würfe verursacht sein. Das übermäßige Hefewachstum, insbesondere von einigen *Candida*-Arten, im GIT des Menschen zieht immer die Aufmerksamkeit der Mediziner auf den Gesundheitszustand der Patienten auf sich. Gerade im Zusammenhang mit einer ausgeprägten Immunschwäche wird ein übermäßiges Hefewachstum als bedrohlich angesehen (Schulze und Sonnenborn, 2009). Trotz eines relativ hohen Hefekeimgehalts traten in unserem Experiment bei den Ferkeln keine Krankheitserscheinun-

gen auf. Auffällig ist dabei, dass in der Literatur keine mit dem Auftreten von *K. slooffiae* assoziierten Erkrankungen beim Schwein beschrieben sind. Im Gegenteil, diese Hefeart war im Organismus der durch Futterumstellung und Verdauungsstörungen immungeschwächten Tiere nicht kultivierbar (Gedek, 1968). Da *K. slooffiae* nur bei klinisch unauffälligen Tieren nachweisbar ist, ist zu vermuten, dass diese Hefe als möglicher Kommensale des Wirtes zu betrachten ist (Gedek, 1968). Deshalb sind positive Effekte auf die intestinale Mikrobiota und die Immunabwehr des Wirtes denkbar.

Der Gastrointestinaltrakt beherbergt eine enorme Anzahl prokaryotischer und eukaryotischer Mikroorganismen. Die Hefen besiedeln dieses Ökosystem im Verhältnis zu den Bakterien zahlenmäßig wesentlich geringer. Daher wird den einzelligen Pilzen im Allgemeinen eine untergeordnete Rolle im GIT nachgesagt. Da einige Hefezellen jedoch hundertfach größer sind als Bakterien, könnten sie selbst bei niedriger Quantität von physiologischer Bedeutung für den Wirt sein (Gatesoupe, 2007).

6.5. DGGE-Analyse

Um das Laufverhalten der Sequenzen der im Schweinedarm vorkommenden Hefen zu untersuchen, wurden einige DNA-Isolate von kultivierten und im Experiment A identifizierten Hefen eingesetzt. Für die PCR wurden die Primer NL1-GC und LS2 angewendet. Diese Primer wurden bereits erfolgreich für die DGGE-Analyse von Hefepopulationen in Milch (Cocolin *et al.*, 2002), Öl (Hesham *et al.*, 2006) und Wein (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004) verwendet. Im Allgemeinen zeigten die amplifizierten DNA-Fragmente der Hefen in unseren Analysen eine gute Bandendifferenzierung. Das war jedoch bei *C. parapsolosis*, *C. oleophila* und *C. tropicalis* nicht der Fall. Die Sequenzen dieser Hefen denaturierten alle im gleichen Bereich (Abb. 14), wodurch eine Identifizierung dieser 3 Hefespezies anhand der unterschiedlichen Bandenpositionen unmöglich ist. Cocolin *et al.* (2000) berichteten über die schlechte Differenzierung zwischen Banden von eng verwandten Spezies, deren Sequenzen mit dem genannten Primer-Set amplifiziert wurden. Der Grund dafür, dass in der vorliegenden Studie die Sequenzen von drei Hefearten im gleichen Bereich denaturiert wurden, kann die ähnliche Zusammensetzung der untersuchten Nukleotidsequenzen dieser Hefen ($46,1 \pm 0,5$ % GC-Gehalt) sein. Interessant waren

die Ergebnisse der DGGE-Analyse der *K. slooffiae* Stämme. Im Gegensatz zu dem Stamm aus eigener Studie bildeten die Sequenzen der Stämme aus der CBS-Kollektion zwei getrennte Banden. Die Bildung mehreren Banden von einer Spezies wurde bereits bei Bakterien (Nübel *et al.*, 1996; Ercolini, 2004) und Hefen (Masoud *et al.*, 2004; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004) beschrieben. Dieser Effekt wird möglicherweise durch die intragenomische Heterogenität in den ribosomalen RNA-Regionen vieler Bakterien- (Coenye und Vandamme, 2003; Crosby und Criddle, 2003) und einiger Hefearten (Lachance *et al.*, 2003) hervorgerufen.

Durch einen Vergleich der DGGE mit der klassischen Kultivierung von Weinhefen fanden Prakitchaiwattana *et al.* (2004), dass die DGGE unempfindlicher für die Detektion geringer Quantitäten ist. Jedoch haben die Autoren in ihren Untersuchungen mit der DGGE und anschließender Bandensequenzierung eine größere Artenvielfalt gefunden. Diese Aussage deutet erneut auf die Existenz von lebenden, aber nicht kultivierbaren Hefen hin (Divol und Lonvaud-Funel, 2005).

Die Anwendung einer Nested-PCR bietet die Möglichkeit, die Ziel-DNA zu spezifizieren sowie auch geringe Templatemengen nachzuweisen (Ibeas *et al.*, 1996). Da Hefen in geringer Anzahl im Schweinedarm vorkommen, wurde die Effizienz der Nested-PCR mit einer einstufigen PCR verglichen. Außer höheren Konzentrationen der PCR-Produkte waren in dieser Studie keine weiteren Unterschiede zwischen den PCR-Methoden in den DGGE-Gelen sichtbar. Mittels DGGE konnte bei abgesetzten Ferkeln nur die Bande einer Hefe-Spezies nachgewiesen und als *K. slooffiae* identifiziert werden. Fünf Tage nach dem Absetzen waren in zwei von vier Proben der EAS-Ferkel die für *K. slooffiae* spezifische Bande zu sehen, während sechs Tage danach (39. LT) die Bande nur in einer Probe ermittelt wurde. Wenn man in Betracht zieht, dass die Mikroorganismen, deren Anteil < 1 % des gesamten Ökosystems beträgt und bei der DGGE nicht detektiert werden (Muyzer und Smalla, 1998), befinden sich vermutlich die meisten Hefen im GIT der Ferkel mit fortschreitender Entwicklung der bakteriellen Mikrobiota unterhalb der detektierbaren Grenze. Im Darm der KF-Ferkel hat die Konzentration der Hefen im Gegensatz zu den EAS-Ferkeln mit steigendem Alter zugenommen. Von den DNA-Isolaten vom Kot der Sauen und der Buchtenböden wurden keine PCR-Produkte amplifiziert. Die Ursachen dafür sind vermutlich unterschiedlich. Die Proben vom Boden beinhalteten nicht nur Exkremente, sondern auch Sägespäne und andere Partikel des Einstreumaterials, wodurch im Endeffekt möglicherweise die

niedrige Konzentration an genomischem Material in der Probe verursacht wurde. Gemessen an Hand der KBE/g Probe waren die Muttersauen durchschnittlich geringer als ihre Ferkel mit Hefen besiedelt. Es ist zu vermuten, dass dadurch die Hefe-DNA-Konzentration der Isolate unter der Detektionsgrenze lag.

6.6. Kultivierungsabhängige Charakterisierung der Hefen

Einer der wichtigsten Regelfaktoren der mikrobiellen Besiedlung ist die Fähigkeit der Mikroorganismen, die im Ökosystem vorhandenen Nährstoffe für ihren Stoffwechsel nutzen zu können. Um die Fähigkeiten der im Schweinedarm vorkommenden Hefen dahingehend zu überprüfen, wurden einige Stämme dem Assimilations-, Fermentations- und Enzymtest unterzogen.

6.6.1. Assimilations- und Fermentationstests

Beim ID 32C System bilden die Ergebnisse der verschiedenen Reaktionen ein biochemisches Profil des Stammes, das die Identifizierung der Hefen ermöglicht. In unserem Fall beabsichtigten wir, den Test lediglich für die metabolische Charakterisierung der bereits identifizierten Hefen zu verwenden. Drei Spezies (*K. slooffiae*, *C. catenulata* und *G. geotrichum*) wurden mittels Anwendung des ID 32C Systems und des Assimilationstests in Mikrotiterplatten untersucht. Die Stoffwechselaktivität der in unserem Versuch dominanten Spezies *K. slooffiae* ließ sich mit dem ID 32C System nicht testen. Obwohl eine der C-Quellen im System Glucose war, wuchs *K. slooffiae* nicht. Offensichtlich waren die Arbeitsbedingungen, die bei dieser Methode zur Anwendung kamen, nicht für diese Hefeart geeignet. Daher war es erforderlich, nach Alternativen zu suchen. Die Mikrotiterplatten mit 96 Wells bieten eine gute Möglichkeit, die zu testende Kultur gleichzeitig auf die Verwertung mehrerer Substraten zu untersuchen. Für die Auswertung sollte neben der visuellen Beurteilung (VB) ein mathematisches Modell entwickelt und genutzt werden. Letzteres war jedoch auf Grund des variablen, artenspezifischen Verhaltens der Keime in den Substraten schwierig zu interpretieren und führte zum Teil im Vergleich zur VB zu falschen Ergebnissen. Infolgedessen wurden nur die Ergebnisse der VB in Betracht gezogen. Zusätzliche Information gibt eine Untersuchung des Fermentationsvermögens der Hefen.

Die Daten von *C. catenulata* und *G. geotrichum* wiesen mit geringen Differenzen im Assimilations- und Fermentationstest weitestgehend ähnliche Ergebnisse auf. Trotz relativ häufiger Isolierung erreichen diese zwei Hefearten nur geringe Konzentrationen im Darm der abgesetzten und nicht abgesetzten Ferkel und spielen daher offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle. Deshalb war unser Hauptaugenmerk mehr auf *K. slooffiae* gerichtet.

Anhand des Assimilations- und Fermentationstests wurde festgestellt, dass *K. slooffiae* ausschließlich Glucose assimilieren und fermentieren kann. Dieses Monosaccharid ist ein wichtiger Baustein vieler natürlicher Kohlenhydrate und wird sowohl von Mikroorganismen als auch von tierischen Zellen verstoffwechselt (Drozdowski und Thomson, 2006). Während der Dünndarmpassage unterliegen die leicht verdaulichen Nährstoffe bei Monogastriden im Wesentlichen der enzymatischen Verdauung durch den Wirt (Conway, 1994). Weil die Tiere keine eigenen Enzyme zur Hydrolyse einiger Nahrungsbestandteile wie z. B. Cellulose, Xylane und Pektine bilden, werden diese Substrate zum größten Teil erst im Dickdarm durch die mikrobiellen Enzyme verdaut (Niba *et al.*, 2009). Um festzustellen, ob *K. slooffiae* die vom Wirtsorganismus unverdauten Polysaccharide verstoffwechseln kann, wurden diese Hefestämme einem Enzymtest unterzogen.

6.6.2. Bestimmung der enzymatischen Aktivität von *Kazachstania slooffiae*

Unter Berücksichtigung des hohen quantitativen Auftretens von *K. slooffiae* wurden nur diese Stämme auf das Enzymbildungsvermögen getestet. Mit dem API ZYM Test lassen sich schnell Enzymaktivitäten verschiedener biologischer Materialien - wie z. B. Mikroorganismen, Zellsuspensionen, Gewebe, biologische Flüssigkeiten - nachweisen (Suh *et al.*, 1999; Brasch und Graser, 2005; Ridgway *et al.*, 2008; Pennacchia *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2008; Ben Abdallah *et al.*, 2009), wobei dieses Verfahren laut Herstellerangaben die Genauigkeit photometrischer Methoden nicht erreicht und somit nur zur orientierenden Diagnostik der untersuchten biologischen Materialien verwendet werden kann. Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) und der Leucin-Arylamidase (LA) war bei den Stämmen besonders ausgeprägt. Die AP (Millan, 2006) und die LA (Matsui *et al.*, 2006) kommen in vielen mehrzelligen Lebewesen und Mikroorganismen vor. Die intestinale AP (IAP) spielt eine essentielle Rolle bei der Hydrolyse von Phosphorsäureestern (Carver und Walker, 1995) sowie

bei der Fettabsorption (Narisawa *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2007). In neueren Studien wurde über die Rolle der IAP bei der Detoxifizierung von Lipopolysacchariden (LPS) und bei der Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase berichtet (Bates *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2008). Die LPS sind Bestandteil der Zellwand von intestinalen Gram-negativen Bakterien. Werden LPS im tierischen Körper freigesetzt, sind sie für den endotoxischen Effekt verantwortlich (Beutler und Rietschel, 2003). Durch die Dephosphorylierung des Lipids A, das eine toxische Wirkung im Tier- und Humankörper hat, verhindert die IAP eine Auslösung lebensbedrohlicher Immunreaktionen (Bates *et al.*, 2007; Goldberg *et al.*, 2008). Die intestinale LA (ILA) lokalisiert sich ebenso wie die IAP im Bürstensaum der Darmzotten (Finlay und McCloud, 1990) und hat mehrere Funktionen, wie z. B. Proteinverdauung oder Freisetzung der bioaktiven Peptide (Taylor, 1993; Matsui *et al.*, 2006). Manche Autoren berichten, dass beide Enzyme im Stoffwechsel des probiotischen Hefestammes *S. boulardii* sowohl essentielle trophische Funktionen als auch eine biotherapeutische Wirkung haben (Buts *et al.*, 2002; Buts und De Keyser, 2006; 2006; 2009).

Aus der Darlegung ergibt sich die Fragestellung, welche Nährstoffe aus dem Darminhalt diese Hefeart für ihren Stoffwechsel nutzt. Van Uden und Carmo-Sousa (1962a) haben die Chymusproben von 57 Schweinen - die unterschiedliche Diäten wie Grünfütter, Mischfutter mit Küchenabfällen und Mischfutter auf Getreidebasis bekommen haben - mittels klassischer Kultivierung untersucht. Die genaue Zusammensetzung der verabreichten Rationen haben die Autoren leider nicht angegeben. In ihrer Studie stellten sie fest, dass die meisten Tiere, die eine Getreideration erhalten hatten, eine stärkere Besiedlung mit *K. slooffiae* Spezies aufwiesen. Daher ist zu vermuten, dass die im Getreide enthaltenen Nährstoffe (z. B. Polysaccharide) das Wachstum dieser Hefeart, deren Anteil im Dickdarm am höchsten ist (Van Uden und Carmo-Sousa, 1962a), fördern können. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Literatur haben unsere Ergebnisse des Fermentations- und Assimilationstests eindeutig gezeigt, dass *K. slooffiae* Spezies nur Glucose verwertet (Gedek, 1968; Kurtzman *et al.*, 2005). Es stellt sich allerdings die Frage nach der Glucosequelle im Dickdarm. Die Glucose aus den Futtermitteln wird als Monosaccharid sofort resorbiert. Gleiches passiert auch mit der aus der Stärke entstehenden Glucose, die aber auch von den Mikroorganismen im oberen Verdauungstrakt verwertet werden kann. Im Dickdarm kann Glucose

eigentlich nur noch durch den Abbau der bis dahin unverdauten Polysaccharide entstehen. Jedoch bildet, wie der Enzymtest gezeigt hat, *K. slooffiae* keine Enzyme, die in der Lage sind, Polysaccharide zu der für sie lebensnotwendigen Glucose abzubauen. Somit ergibt sich die Frage, inwieweit der Enzymtest für eine derartige Untersuchung ausreichend präzise und geeignet ist. Da das in unseren Untersuchungen verwendete API ZYM System nur eine geringe Anzahl von Enzymaktivitäten erfasst, ist es nur für orientierende diagnostische Analysen geeignet. Auch ist es fraglich, ob die angewandten Analysebedingungen optimal für diese Hefeart waren. Zur genauen Beurteilung der enzymatischen Aktivität von *K. slooffiae* Spezies sollten deshalb solche Methoden entwickelt und angewandt werden, die entsprechend den Lebensbedingungen dieser Hefespezies optimiert sind.

Da *K. slooffiae* sich im Schweinedarm gut etablieren kann und darüber hinaus eine relativ hohe Konzentration erreicht, beeinflusst diese Spezies möglicherweise durch ihre Stoffwechsel- und Enzymaktivitäten die intestinale Mikrobiota bzw. die Gesundheit der Ferkel insbesondere in der kritischen Absetzperiode positiv.

7. Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit geben einen ausführlichen Überblick über Hefespezies, die zum Zeitpunkt des Absetzens den Ferkeldarm besiedeln bzw. im Ferkeldarm vorkommen. Obwohl im GIT der Ferkel 17 unterschiedliche, zum Teil anlagespezifische Spezies gefunden wurden, kann sich nur *Kazachstania slooffiae* im Darm der augenscheinlich gesunden, abgesetzten Tiere gut etablieren. Dies wurde durch umfangreiche Untersuchungen mittels klassischer Kultivierung und molekularer PCR-DGGE-Fingerprinting-Methoden bestätigt. Die Ergebnisse der enzymatischen Charakterisierung der Hefe demonstrieren das Potential für eine positive Beeinflussung der intestinalen Mikrobiota. Diese Spezies kann mit ihren Enzymaktivitäten vermutlich eine wichtige Rolle bei der Protein- und Fettverdauung spielen und einen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Selbstregulationsmechanismus im Gastrointestinaltrakt der Ferkel leisten. Darüber hinaus lässt sich vermuten, dass eine Veränderung der Zusammensetzung der bakteriellen Population im Darm der Ferkel auf den zunehmenden Hefekeimgehalt zurückzuführen ist. Dieser Effekt trat jedoch ausschließlich nur bei den Tieren aus der konventionell betriebenen Schweineanlage auf. Damit bestätigt sich, dass die vorherrschenden Umwelt- bzw. die hygienischen Bedingungen der Schweineanlage einen wichtigen Einfluss auf die intestinale Hefebesiedlung der Tiere ausüben. Wenn man in Betracht zieht, dass *K. slooffiae* für Schweine ein kommensaler Mikroorganismus ist, der auf die Darmmikrobiota einen positiven Einfluss hat, wirkt sich das Fehlen bzw. das verminderte Auftreten der Spezies bei den Ferkeln aus der Experimentalanlage unter Umständen ungünstig aus. Diese Hefespezies ist thermophil, d. h. sie vermehrt sich nur bei höheren Temperaturen ($> 30\text{ }^{\circ}\text{C}$), wie sie auch im Körper der Schweine vorherrschen. Da *K. slooffiae* ausschließlich nur Glucose verwerten kann, etabliert sich diese Hefe nicht im Darm der Ferkel, wenn die Ferkel keinen Zugang zu Mischfuttermittel haben. Wie zuvor bereits beschrieben wurden alle Ferkel am 28. LT abgesetzt. Die Ferkel der EAS wurden in einen speziell für die Ferkel vorbereiteten Raum, der vorher entsprechend den Vorschriften in dieser Anlage gründlich gereinigt und desinfiziert wurde, aufgestellt. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die niedrige intestinale Besiedlung mit *K. slooffiae* der EAS-Ferkel sein. Eine weitere Ursache für die geringere *K. slooffiae*-Besiedlung der EAS-Ferkel kann in der Präsenz eines, im Vergleich zur kommerziellen Farm anderen *K. slooffiae*-Stammes

vermutet werden, der sich wahrscheinlich infolge der dort vorhandenen unterschiedlichen intestinalen mikrobiellen Population gebildet hat.

Mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit wird der gegenwärtige Kenntnisstand über das Vorkommen von Hefen im Schweinedarm sowie auch deren Funktionen im intestinalen Milieu erweitert. Offengebliebene Fragen sollten Gegenstand weiterer vertiefender Untersuchungen sein. Dabei ist die Fragestellung, inwieweit eventuell eine gezielte Darmbesiedlung der Absetzferkel mit *K. slooffiae* als Probiotikum unter dem Blickwinkel der Erhaltung der Tiergesundheit in dieser kritischen Lebensphase sinnvoll und von praktischem Wert ist.

8. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Biodiversität und die Zusammensetzung der Hefepopulation im Verdauungstrakt der Ferkel vor und nach dem Absetzen zu untersuchen. Weiterhin sollte die Entwicklung der intestinalen Hefebesiedlung unter unterschiedlichen Umgebungs- bzw. Haltungsbedingungen sowie mögliche Interaktionen zwischen Hefen und bakteriellen Gruppen aufgezeigt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit basieren auf Untersuchungen, die klassische, kultivierungsabhängige und moderne, molekularbiologische Methoden umfassen.

Im ersten Experiment wurden die im Rahmen des EU-Projektes „Feed for Pig Health“ gewonnenen Hefekulturen, isoliert aus dem Dünndarm- und Dickdarmchymus von abgesetzten (n = 68) und nicht abgesetzten (n = 27) 39 Tage alten Ferkeln der Deutschen Landrasse (DL) aus zwei Anlagen mit unterschiedlichen Haltungs- und Umweltbedingungen, analysiert. Alle im Versuch genutzten Tiere waren Halbgeschwister. Zunächst sollte untersucht werden, wie sich die intestinale Hefepopulation der Ferkel bei unterschiedlichen Haltungsbedingungen und bei Einsatz des gleichen Futters zusammensetzt. Insgesamt wurden mit Hilfe der Sequenzierung der D1 & D2 Domänen der 26S rDNA von 173 Hefekulturen 17 unterschiedliche Spezies der Abteilungen *Ascomycota* und *Basidiomycota* identifiziert. Die für den Vergleich (EAS vs. KF) der Biodiversität genutzten Parameter - Simpson-Index (7,58 vs. 4,34), Shannon-Index (2,24 vs. 1,65) und Q-Statistik (5,6 vs. 2,4) - bestätigten die erwarteten Unterschiede zwischen den beiden Schweineanlagen. Bestimmte Hefearten waren in beiden Anlagen häufiger anzutreffen, z. B. *Kazachstania (K.) slooffiae* und *Galactomyces geotrichum*, während andere Spezies, z. B. *Rhodotorula mucilaginosa* und *Trichosporon montevidense*, dagegen nur sporadisch auftraten. Im Gegensatz zu den Erwartungen wurde festgestellt, dass die Hefepopulation der Tiere der Experimentalanlage Schwein (EAS) – der Anlage mit den besseren hygienischen Bedingungen - eine höhere Biodiversität hatte. Die in den meisten Proben dieser Tiere gefundenen Spezies waren *K. slooffiae* und *Candida (C.) glabrata*. Bei den Ferkeln aus der kommerziellen Farm (KF) dagegen wurden trotz niedrigerer Diversität vorwiegend drei Spezies - *K. slooffiae*,

Galactomyces geotrichum und *C. catenulata* – isoliert. Aus den Ergebnissen dieser qualitativen Untersuchungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Wie setzt sich die Hefepopulation quantitativ zusammen?
2. Gibt es einen Unterschied in der Hefebesiedlung zwischen Saug- und Absetzferkeln?
3. Wann und wodurch verändert sich die Hefepopulation im Ferkeldarm?
4. Gibt es möglicherweise Interaktionen zwischen der Hefepopulation und der bakteriellen Mikrobiota?

Diesem Fragekomplex sollte im zweiten Experiment nachgegangen werden, das wiederum mit Ferkeln der Rasse DL aus EAS und KF und Einsatz des gleichen Futters durchgeführt wurde. Die Basis dieser Untersuchungen bildeten Kotproben von insgesamt 64 Ferkeln - 16 abgesetzten (ABF) und 16 nicht abgesetzten Ferkeln (NAF) aus jeder Anlage - die zum jeweiligen Zeitpunkt direkt aus dem Anus entnommen wurden. Die ABF erhielten nach dem Absetzen (am 28. Lebenstag, LT) ein Ferkelaufzuchtfutter II. Die NAF blieben bis zum 39. LT bei der Sau und bekamen kein Mischfuttermittel. Um den zeitlichen Verlauf der Entwicklung der Hefepopulation und der bakteriellen Besiedlung (Enterobakterien, Enterokokken und Laktobazillen) verfolgen zu können, wurden die frischen Kotproben von allen Ferkeln, den Sauen und den Böden der Buchten am 28., 33. und 39. LT gesammelt. Die mikrobiologische Untersuchung der Futter- und Wasserproben zeigte keine Kontaminationen mit Hefen. Während der Säugezeit, also der Periode ohne feste Nahrungsaufnahme, blieb die gesamte Mikrobiota der NAF unverändert. Bis auf geringe Ausnahmen wurde bei den NAF keine Hefebesiedlung nachgewiesen. Nur bei wenigen Ferkeln traten vereinzelt Hefen (meistens *G. geotrichum*) in sehr geringer Konzentration (10^1 - 10^2 KBE/g Kot) auf. Mit der Futterumstellung von Milch auf feste Nahrung entwickelte sich die Hefepopulation rasant. Bereits 11 Tage nach dem Absetzen erreichte sie hohe Konzentrationen, die zwischen beiden Anlagen unterschiedlich waren (EAS ca. 10^4 ; KF ca. 10^6 KBE/g Kot).

Hinsichtlich der Relation zwischen der bakteriellen Mikrobiota und der Hefepopulation wurden bei den EAS-ABF am 33. und 39. LT keine Veränderungen ermittelt. Bei den KF-ABF dagegen gab es während dieser Periode größere Veränderungen. Diese sind vermutlich auf die signifikante Erhöhung der Laktobakterien ($p < 0,001$), die signifikante Dezimierung der Enterobakterien ($p < 0,01$) sowie die um mehr als das 100-fache gestiegene, intestinale

Hefekonzentration zurückzuführen. Mit Hilfe der Analyse der morphologischen Merkmale der Hefekolonien und der denaturierenden Gradientengelelektrophorese wurde festgestellt, dass die Zunahme der Hefepopulation weitestgehend nur auf das vermehrte, zahlenmäßig hohe Auftreten der *K. slooffiae* Spezies im Ferkeldarm zurückzuführen war. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass, obwohl im ersten Experiment mehrere Hefearten im Darminhalt der Absetzferkel festgestellt wurden, sich letztendlich nur eine Spezies, nämlich *K. slooffiae*, im Darm der augenscheinlich gesunden Ferkel gut etablierte. Die phylogenetische Analyse der 26S rDNA-Sequenzen von *K. slooffiae* zeigte jedoch eine Variabilität der DNA-Fragmente, die im Stammbaum in zwei getrennten Clustern gruppiert sind und sich jeweils einer Stallanlage zuordnen ließen. Dies deutet auf die Präsenz von zwei ortsspezifischen Subspezies hin. Die niedrigere Hefekonzentration im Kot der EAS-Ferkel wird jedoch wahrscheinlich auch durch andere Faktoren, wie z. B. Differenzen in der mikrobiellen Zusammensetzung des Kotes, der Umwelt- und den hygienischen Bedingungen hervorgerufen. Da *K. slooffiae* typisch für den Verdauungstrakt der Schweine und in ihrer Entwicklung auf diesen Wirtsorganismus angewiesen ist, wird eine Kolonisation entweder über den Kot der Muttertiere oder andere Kontaminationen hervorgerufen. Mit Hilfe der Assimilations- und Fermentationstests wurde eindeutig nachgewiesen, dass die Stämme von *K. slooffiae* nur in der Lage sind, Glucose als einzige Kohlenhydratquelle zu verwerten und zu fermentieren, was ein typisches Charakteristikum für diese Spezies ist.

Die Ergebnisse der Prüfung von *K. slooffiae* Stämmen mit Hilfe des API ZYM Systems zeigten eine ausgeprägte Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie der Leucin-Arylamidase. Diese Enzyme sind ebenfalls in verschiedenen Organen der Tiere sowie im Bürstensaum des Darmes zu finden. Dort haben sie wichtige biologische Funktionen bei der Protein- und Fettverdauung sowie bei der Immunabwehr des Wirtes. Daher lässt sich vermuten, dass *K. slooffiae* durch ihre Stoffwechselaktivität und ihre möglichen Interaktionen mit der bakteriellen intestinalen Mikrobiota als Kommensale ein wichtiger Mikroorganismus insbesondere für Ferkel ist.

Die Absetzperiode hat einen erheblichen Einfluss auf die Gesundheit und Wachstumsleistung der Ferkel. Die im Darm lebenden Mikroorganismen sind dabei zur Erhaltung des physiologischen Gleichgewichts von entscheidender Bedeutung. In

den letzten Jahren forschten Wissenschaftler intensiv nach Substanzen und Möglichkeiten, die die Darmmikrobiota positiv beeinflussen. Dazu ist es essentiell, die im GIT ablaufenden physiologischen Prozesse zu kennen und nachvollziehen zu können. Der bakteriellen Mikrobiota wird bei den physiologischen Prozessen im Verdauungstrakt eine besondere Beachtung beigemessen, wogegen den intestinalen Hefen bislang nur wenig Interesse gewidmet wird und deshalb nur wenige wissenschaftliche Erkenntnisse vorliegen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eröffnen ein neues, bisher wenig bekanntes Feld und erweitern den gegenwärtigen Kenntnisstand über das Vorkommen der Hefen und deren Funktionen im Schweinedarm. Unabhängig davon sind weitere Untersuchungen notwendig, um das Verständnis über die Wirkungsweise von Hefen - z. B. von *K. slooffiae* - im GIT und deren Interaktionen mit den intestinalen Bakterien und dem Wirtsorganismus sowie deren mögliche Anwendung als Probiotikum für Absetzferkel zu vervollständigen.

9. Literaturverzeichnis

- Aguilar-Uscanga, B. and J. M. Francois. 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37:268-274.
- Ahmad, S., M. Al-Mahmeed, and Z. U. Khan. 2005. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. *J. Med. Microbiol.* 54:639-646.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.
- Amann, R., B. M. Fuchs, and S. Behrens. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:231-236.
- Anderson, I. C. and J. W. Cairney. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.* 6:769-779.
- Anguita, M., N. Canibe, J. F. Perez, and B. B. Jensen. 2006. Influence of the amount of dietary fiber on the available energy from hindgut fermentation in growing pigs: Use of cannulated pigs and in vitro fermentation. *J. Anim. Sci.* 84:2766-2778.
- Aspres, N. and C. Anderson. 2004. *Malassezia* yeasts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Australas. J. Dermatol.* 45:199-205.
- Bach Knudsen, K. E., B. B. Jensen, J. O. Andersen, and I. Hansen. 1991. Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 2. Microbial activity in the gastrointestinal tract. *Br. J. Nutr.* 65:233-248.
- Backhed, F., R. E. Ley, J. L. Sonnenburg, D. A. Peterson, and J. I. Gordon. 2005. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307:1915-1920.
- Bailey, M., F. J. Plunkett, H. J. Rothkotter, M. A. Vega-Lopez, K. Haverson, and C. R. Stokes. 2001. Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proc. Nutr. Soc.* 60:427-435.
- Bailey, M., K. Haverson, C. Inman, C. Harris, P. Jones, G. Corfield, B. Miller, and C. Stokes. 2005. The influence of environment on development of the mucosal immune system. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:189-198.
- Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. 1990. Yeasts characteristics and identification. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bast, E. 2001. Mikrobiologische Methode: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken. 2. Aufl. ed. Heidelberg; Berlin: Spektrum.

- Bates, J. M., J. Akerlund, E. Mittge, and K. Guillemin. 2007. Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. *Cell Host Microbe* 2:371-382.
- Bateup, J., S. Dobbinson, K. Munoro, M. A. McConell, and G. W. Tannock. 1998. Molecular Analysis of the Composition of *Lactobacillus* Populations Inhabiting the Stomach and Caecum of Pigs. *Microb. Ecol. Health Dis.* 10:95-102.
- Bauer, E., B. A. Williams, H. Smidt, R. Mosenthin, and M. W. Verstegen. 2006a. Influence of dietary components on development of the microbiota in single-stomached species. *Nutr Res Rev.* 19:63-78.
- Bauer, E., B. A. Williams, H. Smidt, M. W. Verstegen, and R. Mosenthin. 2006b. Influence of the gastrointestinal microbiota on development of the immune system in young animals. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 7:35-51.
- Bekatorou, A., C. Psarianos, and A. A. Koutinas. 2006. Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotech.* 44:407-415.
- Ben Abdallah, F., H. Kallel, and A. Bakhrouf. 2009. Enzymatic, outer membrane proteins and plasmid alterations of starved *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* cells in seawater. *Arch. Microbiol.* 191:493-500.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, and E. W. Sayers. 2008. GenBank. *Nucleic Acids Res.* Vol. 37, doi:10.1093/nar/gkn723
- Berg, R. D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.* 4:430-435.
- Beutler, B. and E. T. Rietschel. 2003. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat. Rev. Immunol.* 3:169-176.
- Biasucci, G., B. Benenati, L. Morelli, E. Bessi, and G. Boehm. 2008. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J. Nutr.* 138:1796S-1800S.
- Bibbal, D., V. Dupouy, M. F. Prere, P. L. Toutain, and A. Bousquet-Melou. 2009. Relatedness of *Escherichia coli* Strains with Different Susceptibility Phenotypes Isolated from Swine Feces during Ampicillin Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2999-3006.
- Bik, E. M., P. B. Eckburg, S. R. Gill, K. E. Nelson, E. A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M. J. Blaser, and D. A. Relman. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:732-737.
- Blaut, M. and T. Clavel. 2007. Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *J. Nutr.* 137:751S-755S.
- Bleve, G., L. Rizzotti, F. Dellaglio, and S. Torriani. 2003. Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and

- quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4116-4122.
- Boekhout, T. 2005. Biodiversity: gut feeling for yeasts. *Nature* 434:449-451.
- Bosworth, B. and T. Casey. 1997. Identification of toxin and pilus genes in porcine *Escherichia coli* using polymerase chain reaction (PCR) with multiple primer pairs. 97th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. May 4-8.
- Bottari, B., D. Ercolini, M. Gatti, and E. Neviani. 2006. Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73:485-494.
- Boudry, G., V. Peron, I. Le Huerou-Luron, J. P. Lallès, and B. Seve. 2004. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J. Nutr.* 134:2256-2262.
- Brasch, J. and Y. Graser. 2005. *Trichophyton eboreum* sp nov. Isolated from human skin. *J. Clin. Microbiol.* 43:5230-5237.
- Bryant, D. 2005. On the uniqueness of the selection criterion in Neighbor-Joining. *J. Classif.* 22:3-15.
- Buts, J. P., N. De Keyser, C. Stilmant, E. Sokal, and S. Marandi. 2002. *Saccharomyces boulardii* enhances N-terminal peptide hydrolysis in suckling rat small intestine by endoluminal release of a zinc-binding metalloprotease. *Pediatr. Res.* 51:528-534.
- Buts, J. P. and N. De Keyser. 2006. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Dig. Dis. Sci.* 51:1485-1492.
- Buts, J. P., N. De Keyser, C. Stilmant, E. Delem, F. Smets, and E. Sokal. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatr. Res.* 60:24-29.
- Buts, J. P. 2009. Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Dig. Dis. Sci.* 54:15-18.
- Carver, J. D. and W. A. Walker. 1995. The Role of Nucleotides in Human-Nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 6:58-72.
- Castillo, M., S. M. Martin-Orue, M. Nofrarias, E. G. Manzanilla, and J. Gasa. 2007. Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 124:239-247.
- Castillo, M., S. M. Martin-Orue, J. A. Taylor-Pickard, J. F. Perez, and J. Gasa. 2008. Use of mannanoligosaccharides and zinc chelate as growth promoters and diarrhea preventative in weaning pigs: Effects on microbiota and gut function. *J. Anim Sci.* 86:94-101.

- Chang, H. W., Y. D. Nam, Y. Sung, K. H. Kim, S. W. Roh, J. H. Yoon, K. G. An, and J. W. Bae. 2007. Quantitative real time PCR assays for the enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* and the *Saccharomyces sensu stricto* complex in human feces. *J. Microbiol. Methods* 71:191-201.
- Chang, W. L., H. C. van der Heyde, and B. S. Klein. 1998. Flow cytometric quantitation of yeast a novel technique for use in animal model work and in vitro immunologic assays. *J. Immunol. Methods* 211:51-63.
- Chassard, C., K. P. Scott, P. Marquet, J. C. Martin, C. Del'homme, M. Dapoigny, H. J. Flint, and A. Bernalier-Donadille. 2008. Assessment of metabolic diversity within the intestinal microbiota from healthy humans using combined molecular and cultural approaches. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66:496-504.
- Chen, Y. C., J. D. Eisner, M. M. Kattar, S. L. Rassouljian-Barrett, K. Lafe, S. L. Yarfitz, A. P. Limaye, and B. T. Cookson. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 38:2302-2310.
- Chowdhary, A., S. Ahmad, Z. U. Khan, D. C. Doval, and H. S. Randhawa. 2004. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: A case report and an update. *Indian J. Med. Microbiol.* 22:16-22.
- Chowdhury, S. R., D. E. King, B. P. Willing, M. R. Band, J. E. Beever, A. B. Lane, J. J. Loor, J. C. Marini, L. A. Rund, L. B. Schook, A. G. Van Kessel, and H. R. Gaskins. 2007. Transcriptome profiling of the small intestinal epithelium in germfree versus conventional piglets. *BMC. Genomics* 8:215.
- Cocolin, L., L. F. Bisson, and D. A. Mills. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *Fems Microbiol. Lett.* 189:81-87.
- Cocolin, L., D. Aggio, M. Manzano, C. Cantoni, and G. Comi. 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int. Dairy J.* 12:407-411.
- Coenye, T. and P. Vandamme. 2003. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS Microbiol. Lett.* 228:45-49.
- Conway, P. L. 1994. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: Souffrant, W.B. and Hagemeister, H., editors. *Proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, EAAP Publikation. Research Institute for the Biology of Farm Animals, Dummerstorf, Germany No. 80. pp. 231-240.
- Cook, S. I. and J. H. Sellin. 1998. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 12:499-507.

- Crosby, L. D. and C. S. Criddle. 2003. Understanding bias in microbial community analysis techniques due to rrn operon copy number heterogeneity. *Biotechniques* 34:790-4, 796, 798.
- Czerucka, D., T. Piche, and P. Rampal. 2007. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26:767-778.
- Davis, M. E., C. V. Maxwell, G. F. Erf, D. C. Brown, and T. J. Wistuba. 2004. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. *J. Anim Sci.* 82:1882-1891.
- Dean-Nystrom, E. A., J. F. L. Pohlenz, H. W. Moon, and A. D. O'Brien. 2000. *Escherichia coli* O157 : H7 causes more-severe systemic disease in suckling piglets than in colostrum-deprived neonatal piglets. *Infect. Immun.* 68:2356-2358.
- Delaherche, A., O. Claisse, and A. Lonvaud-Funel. 2004. Detection and quantification of *Brettanomyces bruxellensis* and 'ropy' *Pediococcus damnosus* strains in wine by real-time polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 97:910-915.
- Dicksved, J., M. Lindberg, M. Rosenquist, H. Enroth, J. K. Jansson, and L. Engstrand. 2009. Molecular characterization of the stomach microbiota in patients with gastric cancer and in controls. *J. Med. Microbiol.* 58:509-516.
- Dierick, N. A., I. J. Vervaeke, D. I. Demeyer, and J. A. Decuypere. 1989. Approach to the Energetic Importance of Fiber Digestion in Pigs .1. Importance of Fermentation in the Overall Energy Supply. *Anim. Feed Sci. Technol.* 23:141-167.
- Divol, B. and A. Lonvaud-Funel. 2005. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine. *J. Appl. Microbiol.* 99:85-93.
- Drozdowski, L. A. and A. B. R. Thomson. 2006. Intestinal sugar transport. *World J. Gastroenterol.* 12:1657-1670.
- Dubreuil, J. D. 2008. *Escherichia coli* STb toxin and colibacillosis: knowing is half the battle. *FEMS Microbiol. Lett.* 278:137-145.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman. 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308:1635-1638.
- Eicher, S. D., C. A. McKee, J. A. Carroll, and E. A. Pajor. 2006. Supplemental vitamin C and yeast cell wall beta-glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. *J. Anim Sci.* 84:2352-2360.
- El Sheikha, A. F., A. Condur, I. Metayer, D. D. Le Nguyen, G. Loiseau, and D. Montet. 2009. Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to *Physalis* fruits from Egypt. *Yeast* 26:567-573.

- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* 56:297-314.
- Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini, and V. Vigi. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr. Suppl* 91:48-55.
- Fell, J. W., T. Boekhout, A. Fonseca, G. Scorzetti, and A. Statzell-Tallman. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 3:1351-1371.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fidel, P. L. Jr., J. A. Vazquez, and J. D. Sobel. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:80-96.
- Filioti, J., K. Spiroglou, and E. Roilides. 2007. Invasive candidiasis in pediatric intensive care patients: epidemiology, risk factors, management, and outcome. *Intensive Care Med.* 33:1272-1283.
- Finlay, M. F. and L. McCloud. 1990. Intestinal leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase: genetic regulation and development in mice. *Biochem. Genet.* 28:267-281.
- Fleet, G. H. 2006. The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production. In: Querol, A. and Fleet, G., editors. *The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 2 pp. 11-30.
- Fleet, G. H. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18:170-175.
- Fluckiger, U., O. Marchetti, J. Bille, P. Eggimann, S. Zimmerli, A. Imhof, J. Garbino, C. Rue, D. Pittet, M. Tauber, M. Glauser, and T. Calandra. 2006. Treatment options of invasive fungal infections in adults. *Swiss Med. Wkly.* 136:447-463.
- Fonty, G. and F. Chaucheyras-Durand. 2006. Effects and modes of action of live yeasts in the rumen. *Biologia* 61:741-750.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz, and N. R. Pace. 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104:13780-13785.
- Frank, D. N. and N. R. Pace. 2008. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 24:4-10.
- Freter, R. 1992. Factors affecting the microecology of the gut. In *Probiotics: The Scientific Basis*. R. Fuller, ed. Chapman and Hall, London, pp. 111-144.

- Gatesoupe, F. J. 2007. Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. *Aquaculture* 267:20-30.
- Gedek, B. 1968. Hefen als Krankheitserreger bei Tieren. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Gente, S., N. Desmasures, C. Jacopin, G. Plessis, M. Beliard, J. M. Panoff, and M. Gueguen. 2002. Intra-species chromosome-length polymorphism in *Geotrichum candidum* revealed by pulsed field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 76:127-134.
- Ghera, M. and W. G. Merz. 2009. Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization protocol. *J. Clin. Microbiol.* 47:247-248.
- Girmeria, C., L. Pagano, B. Martino, D. D'Antonio, R. Fanci, G. Specchia, L. Mei, M. Buelli, G. Pizzarelli, M. Venditti, and P. Martino. 2005. Invasive infections caused by *Trichosporon species* and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 43:1818-1828.
- Gleed, P. T. and B. F. Sansom. 1982. Ingestion of iron in sow's faeces by piglets reared in farrowing crates with slotted floors. *Br. J. Nutr.* 47:113-117.
- Goerges, S., J. Mounier, M. C. Rea, R. Gelsomino, V. Heise, R. Beduhn, T. M. Cogan, M. Vancanneyt, and S. Scherer. 2008. Commercial ripening starter microorganisms inoculated into cheese milk do not successfully establish themselves in the resident microbial ripening consortia of a South german red smear cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:2210-2217.
- Goldberg, R. F., W. G. Austen, X. B. Zhang, G. Munene, G. Mostafa, S. Biswas, M. McCormack, K. R. Eberlin, J. T. Nguyen, H. S. Tatlidede, H. S. Warren, S. Narisawa, J. L. Millan, and R. A. Hodin. 2008. Intestinal alkaline phosphatase is a gut mucosal defense factor maintained by enteral nutrition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:3551-3556.
- Hesham, A. E., S. Khan, X. C. Liu, Y. Zhang, Z. Y. Wang, and M. Yang. 2006. Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast* 23:879-887.
- Hierro, N., B. Esteve-Zarzoso, A. Gonzalez, A. Mas, and J. M. Guillamon. 2006. Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7148-7155.
- Hierro, N., B. Esteve-Zarzoso, A. Mas, and J. M. Guillamon. 2007. Monitoring of *Saccharomyces* and *Hanseniaspora* populations during alcoholic fermentation by real-time quantitative PCR. *FEMS Yeast Res.* 7:1340-1349.

- Hill, J. E., R. P. Seipp, M. Betts, L. Hawkins, A. G. Van Kessel, W. L. Crosby, and S. M. Hemmingsen. 2002. Extensive profiling of a complex microbial community by high-throughput sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3055-3066.
- Hill, J. E., S. M. Hemmingsen, B. G. Goldade, T. J. Dumonceaux, J. Klassen, R. T. Zijlstra, S. H. Goh, and A. G. Van Kessel. 2005. Comparison of ileum microflora of pigs fed corn-, wheat-, or barley-based diets by chaperonin-60 sequencing and quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:867-875.
- Hill, M. J. 1997. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 6 Suppl 1:S43-S45.
- Hooper, L. V. and J. I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292:1115-1118.
- Hooper, L. V., T. Midtvedt, and J. I. Gordon. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu. Rev. Nutr.* 22:283-307.
- Hooper, L. V. 2004. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol.* 12:129-134.
- Huang, Q., Q. Hu, and Q. Li. 2007. Identification of 8 foodborne pathogens by multicolor combinational probe coding technology in a single real-time PCR. *Clin. Chem.* 53:1741-1748.
- Huston, S. M. and C. H. Mody. 2009. Cryptococcosis: An Emerging Respiratory Mycosis. *Clin. Chest Med.* 30:253-264.
- Ibeas, J. I., I. Lozano, F. Perdignes, and J. Jimenez. 1996. Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:998-1003.
- Innings, A., M. Ullberg, A. Johansson, C. J. Rubin, N. Noreus, M. Isaksson, and B. Herrmann. 2007. Multiplex real-time PCR targeting the RNase p RNA gene for detection and identification of *Candida* species in blood. *J. Clin. Microbiol.* 45:874-880.
- Jaehrig, S. C., S. Rohn, L. W. Kroh, L. G. Fleischer, and T. Kurz. 2007. In vitro potential antioxidant activity of (1-->3),(1-->6)-beta-D-glucan and protein fractions from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. *J. Agric. Food Chem.* 55:4710-4716.
- James, S. A., M. D. Collins, and I. N. Roberts. 1996. Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:189-194.
- James, S. A., M. D. Collins, and I. N. Roberts. 2001. Phylogenetic analysis of the psychrophobic yeast *Arxiozyma telluris* and the reinstatement of *Candida pintolopesii* (van Uden) Meyer et Yarrow and *Candida slooffii* van Uden et do Carmo Sousa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:1917-1925.

- Janczyk, P., R. Pieper, H. Smidt, and W. B. Souffrant. 2007. Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61:132-140.
- Janczyk, P., P. Trevisi, W. B. Souffrant, and P. Bosi. 2008. Effect of thymol on microbial diversity in the porcine jejunum. *Int. J. Food Microbiol.* 126:258-261.
- Janczyk, P., R. Pieper, V. Urubschurov, K. R. Wendler, and W. B. Souffrant. 2009. Investigations on the Effects of Dietary Essential Oils and Different Husbandry Conditions on the Gut Ecology in Piglets after Weaning. *Int. J. Microbiol.* Vol. 2009 Article ID 730809, doi:10.1155/2009/730809; 9 pages.
- Jarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., editors. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed, Elsevier Amsterdam. pp. 75-107.
- Jensen, B. B. and H. Jorgensen. 1994. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1897-1904.
- Jensen, B. B. 1998. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *J. Anim. Feed Sci.* 7:45-64.
- Jensen, B. B. 2001. Possible ways of modifying type and amount of products from microbial fermentation in the gut. In: Piva, A., Bach-Knudsen, K.E. and Lindenberg, J.E., editors. *Gut Environment of Pigs*. Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp. 181-199.
- Jiang, H. X., D. H. Lu, Z. L. Chen, X. M. Wang, J. R. Chen, Y. H. Liu, X. P. Liao, J. H. Liu, and Z. L. Zeng. 2009. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *Vet. J.* doi:10.1016/j.tvjl.2009.10.017.
- Johnson, L. J., V. Koufopanou, M. R. Goddard, R. Hetherington, S. M. Schafer, and A. Burt. 2004. Population genetics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics* 166:43-52.
- Jouany, J. P., F. Mathieu, J. Senaud, J. Bohatier, G. Bertin, and M. Mercier. 1998. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* on the digestion of the cell wall fraction of a mixed diet in defaunated and refaunated sheep rumen. *Reprod. Nutr. Dev.* 38:401-416.
- Jouany, J. P., J. Gobert, B. Medina, G. Bertin, and V. Julliand. 2008. Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J. Anim Sci.* 86:339-347.
- Jouany, J. P., B. Medina, G. Bertin, and V. Julliand. 2009. Effect of live yeast culture supplementation on hindgut microbial communities and their polysaccharidase and glycoside hydrolase activities in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *J. Anim Sci.* 87:2844-2852.

- Jurgens, M. H., R. A. Rikabi, and D. R. Zimmerman. 1997. The effect of dietary active dry yeast supplement on performance of sows during gestation-lactation and their pigs. *J. Anim Sci.* 75:593-597.
- Kam, A. P. and J. Xu. 2002. Diversity of commensal yeasts within and among healthy hosts. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43:19-28.
- Karkowska-Kuleta, J., M. Rapala-Kozik, and A. Kozik. 2009. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim. Pol.* 56:211-224.
- Kath, F. and W. M. Kulicke. 1999. Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Angew. Makromol. Chem.* 268:59-68.
- Katouli, M., A. Lund, P. Wallgren, I. Kuhn, O. Soderlind, and R. Mollby. 1995. Phenotypic characterization of intestinal *Escherichia coli* of pigs during suckling, postweaning, and fattening periods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:778-783.
- Katouli, M., A. Lund, P. Wallgren, I. Kuhn, O. Soderlind, and R. Mollby. 1997. Metabolic fingerprinting and fermentative capacity of the intestinal flora of pigs during pre- and post-weaning periods. *J Appl. Microbiol.* 83:147-154.
- Kempton, R. A. and L. R. Taylor. 1976. Models and statistics for species diversity. *Nature* 262:818-820.
- Kempton, R. A. and L. R. Taylor. 1978. The Q-statistic and the diversity of floras. *Nature* 275:252-253.
- Konstantinov, S. R., C. F. Favier, W. Y. Zhu, B. A. Williams, J. Klüß, W. B. Souffrant, W. M. de Vos, A. D. Akkermans, and H. Smidt. 2004. Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Anim. Res.* 53:317-324.
- Konstantinov, S. R., A. A. Awati, B. A. Williams, B. G. Miller, P. Jones, C. R. Stokes, A. D. Akkermans, H. Smidt, and W. M. de Vos. 2006. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ. Microbiol.* 8:1191-1199.
- Kornegay, E. T., D. Rhein-Welker, M. D. Lindemann, and C. M. Wood. 1995. Performance and nutrient digestibility in weanling pigs as influenced by yeast culture additions to starter diets containing dried whey or one of two fiber sources. *J. Anim Sci.* 73:1381-1389.
- Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 1997. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J. Clin. Microbiol.* 35:1216-1223.
- Kurtzman, C. P. 1998. Yeast systematics - from phenotype to genotype. *Food Technol. Biotech.* 36:261-266.

- Kurtzman, C. P. and J. W. Fell. 1998. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: Kurtzman, C.P. and Fell, J.W., editors. *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed, Elsevier Amsterdam. pp. 3 - 5.
- Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:331-371.
- Kurtzman, C. P. and C. J. Robnett. 2003. Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res.* 3:417-432.
- Kurtzman, C. P., C. J. Robnett, J. M. Ward, C. Brayton, P. Gorelick, and T. J. Walsh. 2005. Multigene phylogenetic analysis of pathogenic candida species in the *Kazachstania (Arxiozyma) telluris* complex and description of their ascosporic states as *Kazachstania bovina* sp. nov., *K. heterogenica* sp. nov., *K. pintolopesii* sp. nov., and *K. slooffiae* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 43:101-111.
- Kurtzman, C. P. and J. W. Fell. 2006. Yeast systematics and phylogeny - implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Rosa, C.A. and Peter, G., editors. *The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 1 pp. 11-30.
- Lachance, M. A., H. M. Daniel, W. Meyer, G. S. Prasad, S. P. Gautam, and K. Boundy-Mills. 2003. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic. *FEMS Yeast Res.* 4:253-258.
- Lallès, J. P., G. Boudry, C. Favier, N. Le Floc'h, I. Lurona, L. Montagne, I. P. Oswald, S. Pie, C. Piel, and B. Seve. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53:301-316.
- Lallès, J. P., P. Bosi, H. Smidt, and C. R. Stokes. 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* 66:260-268.
- Larpin, S., C. Mondoloni, S. Goerges, J. P. Vernoux, M. Gueguen, and N. Desmasures. 2006. *Geotrichum candidum* dominates in yeast population dynamics in Livarot, a French red-smear cheese. *FEMS Yeast Res.* 6:1243-1253.
- Leaw, S. N., H. C. Chang, H. F. Sun, R. Barton, J. P. Bouchara, and T. C. Chang. 2006. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 44:693-699.
- Leaw, S. N., H. C. Chang, R. Barton, J. P. Bouchara, and T. C. Chang. 2007. Identification of medically important *Candida* and non-*Candida* yeast species by an oligonucleotide array. *J. Clin. Microbiol.* 45:2220-2229.
- Leser, T. D., J. Z. Amenuvor, T. K. Jensen, R. H. Lindecrone, M. Boye, and K. Moller. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:673-690.

- Ley, R. E., D. A. Peterson, and J. I. Gordon. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 124:837-848.
- Ley, R. E., M. Hamady, C. Lozupone, P. J. Turnbaugh, R. R. Ramey, J. S. Bircher, M. L. Schlegel, T. A. Tucker, M. D. Schrenzel, R. Knight, and J. I. Gordon. 2008. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 320:1647-1651.
- Li, J., D. F. Li, J. J. Xing, Z. B. Cheng, and C. H. Lai. 2006. Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J. Anim Sci.* 84:2374-2381.
- Liti, G. and E. J. Louis. 2005. Yeast evolution and comparative genomics. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:135-153.
- Loh, G., M. Eberhard, R. M. Brunner, U. Hennig, S. Kuhla, B. Kleessen, and C. C. Metges. 2006. Inulin alters the intestinal microbiota and short-chain fatty acid concentrations in growing pigs regardless of their basal diet. *J. Nutr.* 136:1198-1202.
- Lopandic, K., S. Zelger, L. K. Banszky, F. Eliskases-Lechner, and H. Prillinger. 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiol.* 23:341-350.
- Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan, and H. J. Flint. 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *J. Appl. Microbiol.* 102:1197-1208.
- Lu, Z. H., H. H. Peng, W. Cao, E. Tatsumi, and L. T. Li. 2008. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria and yeasts from sour Mifen, a traditional fermented rice noodle from China. *J. Appl. Microbiol.* 105:893-903.
- Lukondeh, T., N. J. Ashbolt, and P. L. Rogers. 2003. Evaluation of *Kluyveromyces marxianus* as a source of yeast autolysates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30:52-56.
- Luo, G. Z. and T. G. Mitchell. 2002. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 40:2860-2865.
- Macfarlane, S. and G. T. Macfarlane. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc. Nutr. Soc.* 62:67-72.
- Macfarlane, S. and J. F. Dillon. 2007. Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* 102:1187-1196.
- Mackie, R. I., A. Sghir, and H. R. Gaskins. 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J Clin. Nutr* 69:1035S-1045S.
- Magurran, A. E. 2004. Measuring Biological Diversity. Blackwell Science Ltd. pp. 100-130.

- Mandar, R. and M. Mikelsaar. 1996. Transmission of mother's microflora to the newborn at birth. *Biol. Neonate* 69:30-35.
- Martini, A. 1992. Biodiversity and Conservation of Yeasts. *Biodivers. Conserv.* 1:324-333.
- Martorell, P., A. Querol, and M. T. Fernandez-Espinar. 2005. Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6823-6830.
- Masoud, W., L. B. Cesar, L. Jespersen, and M. Jakobsen. 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21:549-556.
- Mathew, A. G., S. E. Chattin, C. M. Robbins, and D. A. Golden. 1998. Effects of a direct-fed yeast culture on enteric microbial populations, fermentation acids, and performance of weanling pigs. *J. Anim Sci.* 76:2138-2145.
- Matsui, M., J. H. Fowler, and L. L. Walling. 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* 387:1535-1544.
- Mcburney, M. I. and W. C. Sauer. 1993. Fiber and Large-Bowel Energy-Absorption - Validation of the Integrated Ileostomy-Fermentation Model Using Pigs. *J. Nutr.* 123:721-727.
- Medina, B., I. D. Girard, E. Jacotot, and V. Julliand. 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. *J. Anim Sci.* 80:2600-2609.
- Mehnert, B. and U. Koch. 1963. Über das Vorkommen von im Verdauungstrakt des Schweines vermehrungsfähiger Hefen. *Zbl. Bakter. I. Orig.* 188:103-120.
- Melin, L., S. Mattsson, M. Katouli, and P. Wallgren. 2004. Development of post-weaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of *Escherichia coli* strains and rotavirus. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 51:12-22.
- Metzler, B. U., W. Vahjen, T. Baumgartel, M. Rodehutschord, and R. Mosenthin. 2009. Changes in bacterial populations in the ileum of pigs fed low-phosphorus diets supplemented with different sources of fermentable carbohydrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148:70-91.
- Mikkelsen, L. L., C. Bendixen, M. Jakobsen, and B. B. Jensen. 2003. Enumeration of bifidobacteria in gastrointestinal samples from piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:654-658.
- Millan, J. L. 2006. Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic. Signal.* 2:335-341.

- Mo, E. K., J. H. Lee, B. J. Xu, and C. K. Sung. 2004. Identification of yeasts from Korean Feces and prerequisite characterization for preparation of probiotics. *Food Sci. Biotechnol.* 13:63-70.
- Moallem, U., H. Lehrer, L. Livshitz, M. Zachut, and S. Yakoby. 2009. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. *J. Dairy Sci.* 92:343-351.
- Molnar, O., M. Wuczowski, and H. Prillinger. 2008. Yeast biodiversity in the guts of several pests on maize; comparison of three methods: classical isolation, cloning and DGGE. *Mycol. Prog.* 7:111-123.
- Montagne, L., G. Boudry, C. Favier, I. Le Huerou-Luron, J. P. Lallès, and B. Seve. 2007. Main intestinal markers associated with the changes in gut architecture and function in piglets after weaning. *Br. J. Nutr.* 97:45-57.
- Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Muyzer, G. and K. Smalla. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73:127-141.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:317-322.
- Naito, S., H. Hayashidani, K. Kaneko, M. Ogawa, and Y. Benno. 1995. Development of Intestinal Lactobacilli in Normal Piglets. *J. Appl. Bacteriol.* 79:230-236.
- Nakano, T., I. Inoue, I. Koyama, K. Kanazawa, K. I. Nakamura, S. Narisawa, K. Tanaka, M. Akita, T. Masuyama, M. Seo, S. Hokari, S. Katayama, D. H. Alpers, J. L. Millan, and T. Komoda. 2007. Disruption of the murine intestinal alkaline phosphatase gene *Akp3* impairs lipid transcytosis and induces visceral fat accumulation and hepatic steatosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292:G1439-G1449.
- Narisawa, S., L. Huang, A. Iwasaki, H. Hasegawa, D. H. Alpers, and J. L. Millan. 2003. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol. Cell. Biol.* 23:7525-7530.
- Narvhusa, J. A. and T. H. Gadaga. 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 86:51-60.
- Nathan, C. 2004. Antibiotics at the crossroads. *Nature* 431:899-902.
- Niba, A. T., J. D. Beal, A. C. Kudi, and P. H. Brooks. 2009. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: Influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Trop. Anim. Health Prod.* 41:1393-1407.

- Nübel, U., B. Engelen, A. Felske, J. Snaidr, A. Wieshuber, R. I. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* 178:5636-5643.
- Oeztuerk, H. and V. Sagmanligil. 2009. Role of live yeasts in rumen ecosystem. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* 116:244-248.
- Palmer, C., E. M. Bik, D. B. DiGiulio, D. A. Relman, and P. O. Brown. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *Plos Biology* 5:1556-1573.
- Pang, X., X. Hua, Q. Yang, D. Ding, C. Che, L. Cui, W. Jia, P. Bucheli, and L. Zhao. 2007. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME. J.* 1:156-162.
- Parle, J. N. 1957. Yeasts isolated from the mammalian alimentary tract. *J. Gen. Microbiol.* 17:363-367.
- Penders, J., C. Thijs, C. Vink, F. F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P. A. van den Brandt, and E. E. Stobberingh. 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118:511-521.
- Pennacchia, C., G. Blaiotta, O. Pepe, and F. Villani. 2008. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. *J. Appl. Microbiol.* 105:1919-1928.
- Peterson, S. W. and C. P. Kurtzman. 1991. Ribosomal-Rna Sequence Divergence Among Sibling Species of Yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* 14:124-129.
- Pieper, R., P. Janczyk, R. Schumann, and W. B. Souffrant. 2006. The intestinal microflora of piglets around weaning with emphasis on *Lactobacilli*. *Arch. Zootech.* 9:28-40.
- Pieper, R., P. Janczyk, A. Zeyner, H. Smidt, V. Guiard, and W. B. Souffrant. 2008. Ecophysiology of the developing total bacterial and *lactobacillus* communities in the terminal small intestine of weaning piglets. *Microb. Ecol.* 56:474-483.
- Pieper, R., P. Janczyk, V. Urubschurov, U. Korn, B. Pieper, and W. B. Souffrant. 2009. Effect of a single oral administration of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 8862/8866 before and at the time point of weaning on intestinal microbial communities in piglets. *Int. J. Food Microbiol.* 130:227-232.
- Pincus, D. H., S. Orenga, and S. Chatellier. 2007. Yeast identification - past, present, and future methods. *Med. Mycol.* 45:97-121.
- Playford, R. J., C. E. Macdonald, and W. S. Johnson. 2000. Colostrum and milk-derived peptide growth factors for the treatment of gastrointestinal disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* 72:5-14.

- Pottier, I., S. Gente, J. P. Vernoux, and M. Gueguen. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. Int. J. Food Microbiol. 126:327-332.
- Prakitchaiwattana, C. J., G. H. Fleet, and G. M. Heard. 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. FEMS Yeast Res. 4:865-877.
- Pryce, T. M., S. Palladino, I. D. Kay, and G. W. Coombs. 2003. Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. Med. Mycol. 41:369-381.
- Pryde, S. E., A. J. Richardson, C. S. Stewart, and H. J. Flint. 1999. Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. Appl. Environ. Microbiol. 65:5372-5377.
- Radosavljevic, M., H. Koenig, V. Letscher-Bru, J. Waller, F. Maloisel, B. Lioure, and R. Herbrecht. 1999. *Candida catenulata* fungemia in a cancer patient. J. Clin. Microbiol. 37:475-477.
- Raspor, P. and J. Zupan. 2006. Yeast in Extreme Environments. In: Rosa, C.A. and Peter, G., editors. The Yeast Handbook. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 371-417.
- Richardson, M. D. 2005. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. J. Antimicrob. Chemother. 56 Suppl 1:i5-i11.
- Ridgway, I. D., H. J. Small, R. J. A. Atkinson, H. T. Birkbeck, A. C. Taylor, and D. M. Neil. 2008. Extracellular proteases and possible disease related virulence mechanisms of two marine bacteria implicated in an opportunistic bacterial infection of *Nephrops norvegicus*. J. Invertebr. Pathol. 99:14-19.
- Rigby, S., G. W. Procop, G. Haase, D. Wilson, G. Hall, C. Kurtzman, K. Oliveira, S. Von Oy, J. J. Hyldig-Nielsen, J. Coull, and H. Stender. 2002. Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles. J. Clin. Microbiol. 40:2182-2186.
- Roder, C., H. Konig, and J. Frohlich. 2007. Species-specific identification of *Dekkera/Brettanomyces* yeasts by fluorescently labeled DNA probes targeting the 26S rRNA. FEMS Yeast Res. 7:1013-1026.
- Rosa, C. A. and G. Peter. 2006. The Yeast Handbook: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Rozeboom, D. W., D. T. Shaw, R. J. Tempelman, J. C. Miguel, J. E. Pettigrew, and A. Connolly. 2005. Effects of mannan oligosaccharide and an antimicrobial product in nursery diets on performance of pigs reared on three different farms. J. Anim Sci. 83:2637-2644.
- Ruan, S. Y. and P. R. Hsueh. 2009. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. J. Formos. Med. Assoc. 108:443-451.

- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Salinas, F., D. Garrido, A. Ganga, G. Veliz, and C. Martinez. 2009. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiol.* 26:328-332.
- Sansom, B. F. and P. T. Gleed. 1981. The ingestion of sow's faeces by suckling piglets. *Br. J. Nutr.* 46:451-456.
- Schierack, P., N. Walk, K. Reiter, K. D. Weyrauch, and L. H. Wieler. 2007. Composition of intestinal *Enterobacteriaceae* populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* 153:3830-3837.
- Schroeder, K. and A. Nitsche. 2009. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. *Mol. Cell Probes* 24:110-113.
- Schulze, J. and U. Sonnenborn. 2009. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. *Dtsch. Arztebl. Int.* 106:837-842.
- Scorzetti, G., J. W. Fell, A. Fonseca, and A. Statzell-Tallman. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Res.* 2:495-517.
- Scupham, A. J., L. L. Presley, B. Wei, E. Bent, N. Griffith, M. McPherson, F. Zhu, O. Oluwadara, N. Rao, J. Braun, and J. Borneman. 2006. Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:793-801.
- Servin, A. L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:405-440.
- Sgro, C. M. and A. A. Hoffmann. 2004. Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity* 93:241-248.
- Shen, Y. B., X. S. Piao, S. W. Kim, L. Wang, P. Liu, I. Yoon, and Y. G. Zhen. 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J. Anim Sci.* 87:2614-2624.
- Shepard, J. R., R. M. Addison, B. D. Alexander, P. Della-Latta, M. Gherna, G. Haase, G. Hall, J. K. Johnson, W. G. Merz, H. Peltroche-Llacsahuanga, H. Stender, R. A. Venezia, D. Wilson, G. W. Procop, F. Wu, and M. J. Fiandaca. 2008. Multicenter evaluation of the *Candida albicans/Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* 46:50-55.
- Shirkey, T. W., R. H. Siggers, B. G. Goldade, J. K. Marshall, M. D. Drew, B. Laarveld, and A. G. Van Kessel. 2006. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp. Biol. Med.* (Maywood.) 231:1333-1345.

- Simpson, J. M., V. J. McCracken, B. A. White, H. R. Gaskins, and R. I. Mackie. 1999. Application of denaturant gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J. Microbiol. Methods* 36:167-179.
- Smith, C. J. and A. M. Osborn. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 67:6-20.
- Sniegowski, P. D., P. G. Dombrowski, and E. Fingerman. 2002. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res.* 1:299-306.
- Songer, J. G. and F. A. Uzal. 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest* 17:528-536.
- Sorum, H. and M. Sunde. 2001. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Vet. Res.* 32:227-241.
- Spark, M., H. Paschertz, and J. Kamphues. 2005. Yeast (different sources and levels) as protein source in diets of reared piglets: effects on protein digestibility and N-metabolism. *J. Anim Physiol Anim Nutr. (Berl)* 89:184-188.
- Spencer, J. F. T. and D. M. Spencer. 1997. Yeasts in natural and artificial habitats. Springer-Verlag, Berlin. pp.59-60.
- Stanton, C., R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and D. Van Sinderen. 2005. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:198-203.
- Stender, H., C. Kurtzman, J. J. Hyldig-Nielsen, D. Sorensen, A. Broome, K. Oliveira, H. Perry-O'Keefe, A. Sage, B. Young, and J. Coull. 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (Brettanomyces) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:938-941.
- Stewart, J. A., V. S. Chadwick, and A. Murray. 2005. Investigations into the influence of host genetics on the predominant eubacteria in the faecal microflora of children. *J. Med. Microbiol.* 54:1239-1242.
- Stokes, C. R., M. Bailey, K. Haverson, C. Harris, P. Jones, C. Inman, S. Pie, I. P. Oswald, B. A. Williams, A. D. L. Akkermans, E. Sowa, H. J. Rothkotter, and B. G. Miller. 2004. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Anim. Res.* 53:325-334.
- Suezawa, Y., I. Kimura, M. Inoue, N. Gohda, and M. Suzuki. 2006. Identification and typing of miso and soy sauce fermentation yeasts, *Candida etchellsii* and *C. versatilis*, based on sequence analyses of the D1D2 domain of the 26S ribosomal RNA gene, and the region of internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70:348-354.

- Suh, H., J. E. Lee, J. C. Park, D. W. Han, C. S. Yoon, Y. H. Park, and B. K. Cho. 1999. Viability and enzymatic activity of cryopreserved porcine heart valve. *Yonsei Med. J.* 40:184-190.
- Suh, S. O., J. V. Mchugh, D. D. Pollock, and M. Blackwell. 2005. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. *Mycol. Res.* 109:261-265.
- Swords, W. E., C. C. Wu, F. R. Champlin, and R. K. Buddington. 1993. Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Biol. Neonate* 63:191-200.
- Taillon, C., E. Nadeau, M. Mourez, and J. D. Dubreuil. 2008. Heterogeneity of *Escherichia coli* STb enterotoxin isolated from diseased pigs. *J. Med. Microbiol.* 57:887-890.
- Tamura, K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10:512-526.
- Taras, D., W. Vahjen, and O. Simon. 2007. Probiotics in pigs - modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. *Livest. Sci.* 108:229-231.
- Taylor, A. 1993. Aminopeptidases: structure and function. *FASEB J.* 7:290-298.
- Thompson, C. L., B. Wang, and A. J. Holmes. 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME. J.* 2:739-748.
- Thompson, C. L. and A. J. Holmes. 2009. A window of environmental dependence is evident in multiple phylogenetically distinct subgroups in the faecal community of piglets. *FEMS Microbiol. Lett.* 290:91-97.
- Tuon, F. F. and S. F. Costa. 2008. *Rhodotorula* infection. A systematic review of 128 cases from literature. *Rev. Iberoam. Micol.* 25:135-140.
- Urso, R., K. Rantsiou, P. Dolci, L. Rolle, G. Comi, and L. Cocolin. 2008. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. *FEMS Yeast Res.* 8:1053-1062.
- Urubschurov, V., P. Janczyk, R. Pieper, and W. B. Souffrant. 2008. Biological diversity of yeasts in the gastrointestinal tract of weaned piglets kept under different farm conditions. *FEMS Yeast Res.* 8:1349-1356.
- Valdes-Stauber, N., S. Scherer, and H. Seiler. 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 34:115-129.
- Valenti, P. and G. Antonini. 2005. Lactoferrin: an important host defence against microbial and viral attack. *Cell Mol. Life Sci.* 62:2576-2587.

- Van der Peet-Schwering, C. M., A. J. Jansman, H. Smidt, and I. Yoon. 2007. Effects of yeast culture on performance, gut integrity, and blood cell composition of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 85:3099-3109.
- van Heugten, E., D. W. Funderburke, and K. L. Dorton. 2003. Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J. Anim Sci.* 81:1004-1012.
- Van Uden, N. and L. do. Carmo-Sousa. 1957a. Yeasts from the bovine caecum. *J. Gen. Microbiol.* 16:385-395.
- Van Uden, N. and L. do. Carmo-Sousa. 1957b. *Candida slooffii* nov.sp., a thermophilic and vitamin deficient yeast from the equine intestinal tract. *Portug. Acta Biol* V:7-17.
- Van Uden, N., L. do. Carmo-Sousa, and M. Farinha. 1958. On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. *J. Gen. Microbiol.* 19:435-445.
- Van Uden, N. 1960. The occurrence of *Candida* and other yeasts in the intestinal tracts of animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 89:59-68.
- Van Uden, N. and L. do. Carmo-Sousa. 1962a. Quantitative aspects of the intestinal yeast flora of swine. *J. Gen. Microbiol.* 27:35-40.
- Van Uden, N. and L. do. Carmo-Sousa. 1962b. On the Intestinal Yeast Flora of Free Living Hippopotami (*Hippopotamus Amphibius*), Wart Hogs (*Phacochoerus Aethiopicus*) and Bush Pigs (*Potamochoerus Choeropotamus*). *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microb. Serology* 28:73-77.
- Veal, D. A., D. Deere, B. Ferrari, J. Piper, and P. V. Attfield. 2000. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods* 243:191-210.
- Viljoen, B. C. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Int. J. Food Microbiol.* 69:37-44.
- Viljoen, B. C. 2006. Yeast Ecological Interactions. Yeast-Yeast, Yeast-Bacteria, Yeast-Fungi Interactions and Yeast as Biocontrol Agents. In: Querol, A. and Fleet, G., editors. *The Yeast Handbook: Yeasts in Food and Beverages*. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Vol. 2 pp. 83-110.
- Wieler, L. H., A. Ilieff, W. Herbst, C. Bauer, E. Vieler, R. Bauerfeind, K. Failing, H. Klos, D. Wengert, G. Baljer, and H. Zahner. 2001. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 48:151-159.
- Willing, B. P. and A. G. Van Kessel. 2009. Intestinal microbiota differentially affect brush border enzyme activity and gene expression in the neonatal gnotobiotic pig. *J. Anim Physiol Anim Nutr. (Berl)* 93:586-595.
- Wilson, D. A., M. J. Joyce, L. S. Hall, L. B. Reller, G. D. Roberts, G. S. Hall, B. D. Alexander, and G. W. Procop. 2005. Multicenter evaluation of a *Candida*

- albicans* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures. J. Clin. Microbiol. 43:2909-2912.
- Wong, J. M. W., R. de Souza, C. W. C. Kendall, A. Emam, and D. J. A. Jenkins. 2006. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. J. Clin. Gastroenterol. 40:235-243.
- Wu, Z. W. and F. Y. Bai. 2005. *Kazachstania aquatica* sp nov and *Kazachstania solicola* sp nov., novel ascomycetous yeast species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:2219-2224.
- Xu, R. J., F. Wang, and S. H. Zhang. 2000. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. Livest. Prod. Sci. 66:95-107.
- Xufre, A., H. Albergaria, J. Inacio, I. Spencer-Martins, and F. Girio. 2006. Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. Int. J. Food Microbiol. 108:376-384.
- Yen, J. T., J. A. Nienaber, D. A. Hill, and W. G. Pond. 1991. Potential Contribution of Absorbed Volatile Fatty-Acids to Whole-Animal Energy Requirement in Conscious Swine. J. Anim. Sci. 69:2001-2012.
- Zanello, G., F. Meurens, M. Berri, and H. Salmon. 2009. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. Curr. Issues Mol. Biol 11:47-58.
- Zeyner, A. and E. Boldt. 2006. Effects of a probiotic *Enterococcus faecium* strain supplemented from birth to weaning on diarrhoea patterns and performance of piglets. J. Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 90:25-31.
- Zoetendal, E. G., A. D. Akkermans, W. M. Akkermans-van Vliet, J. de Visser, and W. M. de Vos. 2001. The Host Genotype Affects the Bacterial Community in the Human Gastrointestinal Tract. Microb. Ecol. Health Dis. 13:129-134.
- Zoetendal, E. G., E. E. Vaughan, and W. M. de Vos. 2006. A microbial world within us. Mol. Microbiol. 59:1639-1650.

Anhang

Tab. A 1: Zusammensetzung der vitaminisierten Mineralstoffmischung im Experiment A (0,4 % je kg Futter)

Inhaltsstoffe	Gehalt pro kg
Vitamin A	1750 I.E.
Vitamin D3	200 I.E.
Vitamin E	11 I.E.
Vitamin B1	1,0 mg
Vitamin B2	4,0 mg
Vitamin B6	1,5 mg
Vitamin B12	15,0 µg
Vitamin K1	0,5 mg
Biotin	50,0 µg
Pantothensäure	9,0 mg
Nicotinsäure	12,5 mg
Cholin	400,0 mg
Folsäure	0,30 mg
Fe	80,0 mg
Zn	54,0 mg
Mn	30,0 mg
Se	0,3 mg
I	0,1 mg
Co	0,2 mg
Antioxidantien (E 310, E 320, E 321)	50,0 mg

Tab. A 2: Interpretation der McFarland Standardreihen

Standard	Hefekeimzahl ^a lg KBE/ml
2	6,6
5	7,1

^a Mittelwerte der im Labor vom Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf ermittelten Hefekeimzahlen (*K. slooffiae*).

Tab. A 3: Zusammensetzung des API ID 32C Streifens

Nr	Substrate	Menge [mg/Vert.]	Nr	Substrate	Menge [mg/Vert.]
1	D–Galactose	0,70	17	D–Sorbit	2,72
2	Cycloheximid	0,014	18	D–Xylose	0,70
3	D–Saccharose	0,66	19	D–Ribose	0,70
4	N–Acetyl–Glycosamin	0,64	20	Glycerol	0,82
5	Milchsäure	0,64	21	L–Rhamnose	0,68
6	L–Arabinose	0,70	22	Palatinose	0,66
7	D–Cellobiose	0,66	23	Erythrit	1,44
8	D–Raffinose	2,34	24	D–Melibiose	0,66
9	D–Maltose	0,70	25	Natrium Glycuronat	0,76
10	D–Trehalose	0,66	26	D–Melezitose	0,66
11	Kalium 2–Ketogluconat	1,09	27	Kalium Gluconat	0,92
	Methyl–αD–			Levulinsäure	
12	Glucopyranosid	1,92	28	(Levulinat)	0,48
13	D–Mannit	0,68	29	D–Glucose	0,78
14	D–Lactose	0,70	30	L–Sorbose	0,70
15	Inosit	0,70	31	Glucosamin	0,68
16	Kontrolle	–	32	Äsculin	0,28
				Eisencitrat	0,069

Tab. A 4: Zusammensetzung des API ZYM Streifens

N°	Enzymnachweis	Substrat	Reaktion	
			Positiv	Negativ
1	Kontrolle		farblos oder Farbe der Probe bei starker	
2	Alkalische Phosphatase	2-Naphtylphosphat	violett	farblos oder sehr helles gelb*
3	Esterase (C 4)	2-Naphtylbutyrat	violett	
4	Esterase Lipase (C 8)	2-Naphtylcaprylat	violett	
5	Lipase (C 14)	2-Naphtylmyristat	violett	
6	Leucin Arylamidase	L-leucyl-2-naphtylamid	orange	
7	Valin Arylamidase	L-valyl-2-naphtylamid	orange	
8	Cystin Arylamidase	L-cystyl-2-naphtylamid	orange	
9	Trypsin	N-benzoyl-DL-arginin-2-naphtylamid	orange	
10	α -Chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanin-2-naphtylamid	orange	
11	Saure Phosphatase	2-Naphtylphosphat	violett	
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	Naphtol-AS-BI-phosphat	blau	
13	α -Galactosidase	6-Br-2-naphtyl- α D-Galactopyranosid	violett	
14	β -Galactosidase	2-Naphtyl- β D-Galactopyranosid	violett	
15	β -Glucuronidase	Naphtol-AS-BI- β D-Glucuronid	blau	
16	α -Glucosidase	2-Naphtyl- α D-Glucopyranosid	violett	
17	β -Glucosidase	6-Br-2-naphtyl- β D-Glucopyranosid	violett	
18	N-acetyl- β -Glucosaminidase	1-Naphtyl-N-acetyl- β D-Glucosaminid	braun	
19	α -Mannosidase	6-Br-2-naphtyl- α D-mannopyranosid	violett	
20	α -Fucosidase	2-Naphtyl- α L-fucopyranosid	violett	

* Farblos oder Farbe der Kontrolle, wenn der Streifen nach der Reagenzzugabe einer starken Lichtquelle ausgesetzt wird.

Tab. A 5: Für die phylogenetische Analyse verwendete Accessionsnummern der NCBI Gendatenbank von eigenen und Referenzsequenzen

Spezies	eigene Studie	NCBI Gen-Datenbank
<i>Kazachstania slooffiae</i>	EU445375; EU445374; EU445394–EU445437	AJ508582
<i>Galactomyces geotrichum</i>	EU445444	DQ907938
<i>Candida catenulata</i>	EU445381	EU585763
<i>Candida glabrata</i>	EU445377	EU585756
<i>Trichosporon asahii</i>	EU445389	EU559350
<i>Issatchenkia orientalis</i>	EU445384	EU585760
<i>Trichosporon coremiiforme</i>	EU445390	AF189863
<i>Pichia fermentans</i>	EU445387	EU019222
<i>Candida tropicalis</i>	EU445382	EU293420
<i>Pichia anomala</i>	EU445385	EU327111
<i>Candida oleophila</i>	EU445378	AF178051
<i>Candida parapsilosis</i>	EU445379	EF063136
<i>Candida silvae</i>	EU445380	AB281078
<i>Pichia farinosa</i>	EU445386	EF453650
<i>Pichia guilliermondii</i>	EU445391	EU327094
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EU445388	EU285499
<i>Trichosporon montevidense</i>	EU445392	AF105397
<i>Exobasidium vaccinii</i>	–	AF009858

Tab. A 6: Anordnung der im Assimilationstest verwendeten Substrate auf der Mikrotiterplatte

Nr.	Substrate	Position auf der Mikrotiterplatte	
0	Basal Medium ohne Zusatz (Negativkontrolle)	A1	A6
1	D-Galactose	B1	B6
2	D-Glucose	C1	C6
3	D-Saccharose	D1	D6
4	D-Maltose	E1	E6
5	D-Lactose	F1	F6
6	D-Raffinose	G1	G6
7	D-Trehalose	H1	H6
8	Inulin	A2	A7
9	Lösliche Stärke (autoklaviert)	B2	B7
10	D-Melibiose	C2	C7
11	D-Cellobiose	D2	D7
12	D-Xylose	E2	E7
13	D-Melezitose	F2	F7
14	L-Arabinose	G2	G7
15	D-Arabinose	H2	H7
16	D-Ribose	A3	A8
17	L-Rhamnose	B3	B8
18	L-Sorbose	C3	C8
19	meso-Erythritol	D3	D8
20	D-Sorbit	E3	E8
21	Galaktitol	F3	F8
22	Glycerol	G3	G8
23	Inositol	H3	H8
24	D-Mannitol	A4	A9
25	Ribitol	B4	B9
26	Ethanol	C4	C9
27	Methanol	D4	D9
28	Citronensäure	E4	E9
29	Milchsäure	F4	F9
30	Bernsteinsäure	G4	G9
31	D-Gluconsäure	H4	H9
32	α -methyl -D-Glucoside	A5	A10
33	Salicin	B5	B10
34	D-Glucosamine	C5	C10
35	N-Acetyl-Glycosamin	D5	D10
36	Hexadecan	E5	E10
37	Actidion, 0,1%	F5	F10
38	Actidion, 0,01%	G5	G10
39	Lösliche Stärke (tyndalisiert)	H5	H10

Tab. A 7: Stammlösungen für DGGE

Lösungen	Stoffe	Hersteller
100 % Gradientenlösung*	200 ml 40 % Acryl- und Bis- acrylamide, 37,5:1	Hercules, CA, USA
	400 ml Formamid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	10 ml 50 x TAE-Puffer	
	421,6 g Harnstoff	Merck KGaA, Hohenbrunn, Deutschland
	auffüllen mit <i>aqua dest.</i> bis 1 l	
0 % Gradientenlösung*	200 ml 40 % Acryl- und Bis- acrylamide, 37,5:1	Hercules, CA, USA
	10 ml 50 x TAE-Puffer	
	auffüllen mit <i>aqua dest.</i> bis 1 l	
50 x TAE-Puffer	242 g Tris	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
	57,1 ml Essigsäure, 96 %	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
	100 ml 0,5 M EDTA	Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
	auffüllen mit <i>aqua dest.</i> bis 1 l, [pH 8,5]	

* Gradientenlösungen sind im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufzubewahren.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Menschen bedanken, die mich in diesem Lebensabschnitt als Doktorand begleitet und zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich mich ganz herzlich bei Ihnen, Herr Dr. W.-B. Souffrant, dafür bedanken, dass Sie mir nach meinem Praktikum in Ihrer Forschungsgruppe das Angebot machten, eine Promotion zu beginnen. Sie haben mir nicht nur das interessante Thema überlassen, sondern schafften auch durch Ihre ständige Hilfsbereitschaft alle Voraussetzungen für die Entstehung der Dissertationsschrift. Ihre Hinweise und Bemerkungen waren bei meiner Arbeit stets sehr wertvoll. Dank Ihrer enormen Unterstützung eröffneten Sie mir viele interessante Möglichkeiten, wie die Teilnahme an diversen Tagungen, was für meine fachliche und sprachliche Entwicklung sehr förderlich war.

Frau Prof. A. Zeyner, ich danke Ihnen sehr für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Bereitschaft, mich an der Universität Rostock als Promotionsstudent zu betreuen. Weiterhin bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme an Ihrem Lehrstuhl in der Phase der Fertigstellung der Promotion.

Pawel und Robert, Euch danke ich für die tolle Unterstützung im Labor und die Einführung in die molekularbiologischen Methoden. Mit Eurer vorbildlichen Arbeitseinstellung und dem Wissensdrang habt Ihr mich noch mehr zum Lernen angespornt. Die Dienstreisen zu Meetings oder Konferenzen waren für mich immer erlebnisreich. Diese schöne Zeit werde ich in guter Erinnerung behalten. Pawel, ich danke Dir besonders für die Hilfe bei der Anfertigung des Artikels. Mit Deinem Fachwissen hast Du mir viele Ideen gegeben und vieles dazu beigetragen, dass diese Publikation in der Form erschien. Robert, Du hast mir bei meinem Aufenthalt in Kanada sehr geholfen, dafür möchte ich Dir ausdrücklich danken.

Dr. Pascal Leterme und Prof. Andrew van Kessel, ich danke Euch herzlich dafür, dass ich während meines dreimonatigen Aufenthaltes am „Prairie Swine Centre“ und am „Institute of Animal and Poultry Science“ in Saskatoon in Kanada arbeiten durfte.

Allen Doktorandinnen und Doktoranden - insbesondere Julia, Judith und Maria - sowie den Mitarbeitern des Forschungsbereiches Ernährungsphysiologie „Oskar Kellner“ - Frau Köpnick, Frau Prignitz, Frau Würfel, Frau Brüsche und Herrn Booth - mit denen ich seit 2006 arbeiten durfte, möchte ich meine große Dankbarkeit für jegliche Unterstützung ausdrücken. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Booth und Kristian für die Durchführung der Analysen meiner zahlreichen Proben, die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bei den klassischen Untersuchungen im Labor. Danken möchte ich besonders auch Frau Köpnick für die stete Unterstützung - sei es OP, Schlachtung oder Durchführung der Versuche - u. a. auch für die netten Unterhaltungen beim Essen. Zehnping danke ich für die Mitarbeit bei unseren Versuchen. Nicht zu vergessen ☺ ist natürlich Niels, an Dich richte ich einen Riesen-Dank....ja, in der Tat, Du hast auch einen großen Beitrag dazu geleistet. Niels, ich wünsche Dir nach dem erfolgreichen Abiturabschluss die Erfüllung deiner Pläne und alles Gute auf deinem weiteren Weg.

Herrn Dr. Kwella gilt mein Dank für die Überlassung der für meine Arbeit notwendigen Literatursammlung.

Frau Dr. Büsing, Ihnen danke ich sehr dafür, dass Sie trotz Ihres vollen Arbeitsplans die Zeit für das Lesen der Arbeit gefunden haben. Ihre konstruktive Kritik und die Vorschläge haben mir bei der Erstellung der Promotion sehr geholfen.

Frau Strehlow, Frau Bremer, Frau Gall, Sandra, Kristin, Antje und Luis, Euch danke ich für die Geselligkeit und gute Atmosphäre am Institut für Nutztierwissenschaften und Technologie. All dies hat mir in der schwierigen Endphase des Schreibens sehr geholfen.

Ganz besonders danken möchte ich aber meinen Eltern und Schwestern, die mich in aller Hinsicht unterstützt haben und oft, wenn es notwendig war, auf mein Kind aufgepasst haben. Ein besonderes Wort des Dankes richtet sich an meine Frau, die mich stets bestärkt hat und mir die ganze Zeit den Rücken frei gehalten hat, so dass ich alle meine Vorhaben verwirklichen konnte. Damit hat meine gesamte Familie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen meiner Doktorarbeit geleistet und daher widme ich Euch diese Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit ist in der Fassung noch an keiner Prüfungsbehörde vorgelegt worden.

Rostock,

Vladimir Urubschurov

Thesen zur Dissertation:

„Intestinale Hefen, deren Stoffwechselaktivität und Interaktion mit ausgewählten Bakteriengruppen bei Absetzferkeln“

vorgelegt von Dipl.-Ing. agr. Vladimir Urubschurov

Das Absetzen von Ferkeln gilt als eine der kritischsten Phasen in der Schweinehaltung. Dieser Prozess hat einen erheblichen Einfluss auf die Gesundheit und Wachstumsleistung der Tiere und ist oft mit hohen ökonomischen Verlusten verbunden. Die im Darm lebenden Mikroorganismen sind dabei zur Erhaltung des physiologischen Gleichgewichts von entscheidender Bedeutung. Die Darmmikrobiota der Schweine besteht größtenteils aus Bakterien, deren Entwicklung im Darm gut beschrieben und deren Einfluss auf die Gesundheit des Wirtes bekannt ist. Den Hefen im Verdauungstrakt wird dagegen bislang nur wenig Interesse gewidmet. Außerdem ist der gegenwärtige wissenschaftliche Kenntnisstand - der im Allgemeinen auf den klassischen Kultivierungs-Befunden aus den fünfziger und sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts beruht – zu mangelhaft, um die eindeutige Rolle der Hefen im intestinalen Ökosystem nachvollziehen zu können. Um einen Beitrag zur Vervollständigung der bisher lückenhaften wissenschaftlichen Kenntnisse auf dem Gebiet der Hefen im Verdauungstrakt der Ferkel zu leisten, wurden folgende Probleme in der vorliegenden Arbeit untersucht:

- die Biodiversität und Zusammensetzung der Hefepopulation im GIT von Ferkeln der Deutschen Landrasse vor und nach dem Absetzen
- der Einfluss der Umgebungs- bzw. Haltungsbedingungen auf die intestinale Hefepopulation
- die zeitlichen Veränderungen der Hefeentwicklung im Darm der Absetzferkel
- die potenziellen Interaktionen zwischen Hefen und bakteriellen Gemeinschaften wie Enterobakterien, Enterokokken und Laktobazillen
- die Stoffwechselaktivität der im Darm von Ferkeln dominierenden Hefen

Zur Erreichung der genannten Ziele wurden Chymus- und direkt aus dem Anus entnommene Kotproben von abgesetzten - (ABF) und nicht abgesetzten Ferkeln

(NAF) untersucht. Für die Untersuchungen wurden klassische kultivierungsabhängige Verfahren wie Assimilations-, Fermentations-, Enzymtests und Keimzahlbestimmung als auch molekularbiologische Methoden wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR), PCR-denaturierende Gradientengelelektrophorese (PCR-DGGE) und DNA-Sequenzierung angewendet.

Aus den Ergebnissen und Schlussfolgerungen der vorliegenden Untersuchungen werden folgende Thesen abgeleitet:

1. Die Biodiversität der Hefepopulation im Verdauungstrakt der Ferkel hängt von den Umwelt- bzw. hygienischen Bedingungen ab, die in einer Schweineanlage vorherrschen. Durch die Berechnung mehrerer unterschiedlicher Biodiversitäts-Indizes wurde die offensichtlich höhere Hefevielfalt im GIT der Tiere aus der Experimentalanlage Schwein (EAS) - mit besserem Hygiene- und Gesundheitsstatus sowie moderner technischer Ausrüstung - im Vergleich zur kommerzielle Farm (KF) bestätigt.
2. Da im Vergleich zu Bakterien viele Hefen im Darm der Schweine nur in einer geringeren Konzentration auftreten, kann die Biodiversität der intestinalen Hefen mittels DGGE-Analyse - auf Grund der Unempfindlichkeit zur Detektion geringer DNA-Quantitäten - nicht bestimmt werden. Sollen weitere im Darm vorkommende Hefespezies detektiert werden, müssen die Chymus- bzw. Kotproben mit den klassischen Kultivierungsverfahren untersucht werden.
3. Obwohl 2 Hefearten (*Kazachstania (K.) slooffiae* und *Candida glabrata*) in den Tieren der EAS und 3 Hefearten (*K. slooffiae*, *Galactomyces geotrichum* und *Candida catenulata*) bei den Ferkeln aus der KF häufig gefunden wurden, ist nur die Spezies *K. slooffiae* spezifisch für den Verdauungstrakt der Absetzferkel. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Literatur überein.
4. Die auf der klassischen Kultivierung basierende Analyse des Kotes zeigte, dass Hefen im Allgemeinen bei nicht abgesetzten Ferkeln – die bis zum 39. LT als einzige Nahrung ausschließlich Milch bekommen haben - entweder in einer geringen Anzahl (KBE/g Kot) oder gar nicht vorkommen.

5. Bei der mikrobiologischen Untersuchung von Wasser- und Futterproben (Sauen- und Ferkelfutter) waren keine Hefen unter den gewählten Kultivierungsbedingungen anzüchtbar. Damit ist in dieser Studie eine Kontamination der Ferkel mit den oben beschriebenen Hefespezies über Wasser und Futter nahezu auszuschließen.
6. Die Hefepopulation entwickelte sich erst mit der Aufnahme des auf Getreide basierenden Futters. Bereits 11 Tage nach dem Absetzen können die Hefen eine hohe Konzentration im Darm erreichen. Im Darm der 39 Tage alten Ferkel war jedoch die Quantität der Hefen in jeder Anlage unterschiedlich (EAS ca. 10^4 ; KF ca. 10^6 KBE/g Kot). Hiermit wird erneut unterstrichen, dass die vorherrschenden Umwelt- bzw. die hygienischen Bedingungen der Schweineanlage einen wichtigen Einfluss auf die intestinale Hefebesiedlung der Tiere ausüben.
7. Die intestinale Mikrobiota ist ein komplexes Ökosystem und jegliche Veränderung im Milieu wirkt sich umgehend auf dessen mikrobielle Zusammensetzung aus. Mit im Zeitraum 33. bis 39. LT signifikant ($p < 0,004$) zunehmendem Hefewachstum im GIT der KF-Ferkel veränderte sich die Zusammensetzung der bakteriellen Mikrobiota. Es wurde eine signifikante Erhöhung der Kolonien von Laktobazillen ($p < 0,001$) und eine signifikante Dezimierung der Zahl der Enterobakterien ($p < 0,01$) festgestellt. Diese Ergebnisse deuten auf mögliche Interaktionen zwischen Hefen und einigen Bakterien wie z. B. Laktobazillen hin. Bei relativ niedriger Hefekonzentration, wie dies am 33. und 39. LT bei den ABF der EAS der Fall war, konnte keine signifikante Veränderung in der Zusammensetzung der bakteriellen Gruppen festgestellt werden.
8. Zwei unterschiedliche Assimilationstests kamen in dieser Studie zur Anwendung. Die Verwendung des kommerziellen Assimilationstests (ID 32 C System) eignete sich nicht für die Charakterisierung der im Ferkeldarm dominanten *K. slooffiae* Stämme. Die Arbeitsbedingungen, die für diese Methode vorgeschrieben sind, waren wahrscheinlich trotz Modifikation für diese

Hefeart nicht geeignet. Der Assimilationstest in Mikrotiterplatten mit 96 Wells ist sehr zeit- und arbeitsaufwändig, ermöglicht jedoch eine umfassende Untersuchung der zu testenden Hefekultur auf die Verwertung unterschiedlichster Substrate. Im Ergebnis dieses Tests wurde festgestellt, dass *K. slooffiae* nur Glucose verwerten kann.

9. *K. slooffiae* wurde mit dem API ZYM System, das eine Möglichkeit zur Diagnostik der enzymatischen Aktivität verschiedener biologischer Materialien wie z. B. Mikroorganismen, Zellen bietet, getestet. Bei *K. slooffiae* zeigte der Test besondere Aktivitäten von Alkalischer Phosphatase und Leucin-Arylamidase. Beide Enzyme sind auch im Darm zu finden und haben dort wichtige biologische Funktionen bei der Protein- und Fettverdauung sowie bei der Immunabwehr des Wirtes. Wie oben beschrieben soll das System, unter anderem auf Grund der Aktivitätserfassung einer nur geringen Anzahl von Enzymen, vordergründig zur diagnostischen Analyse dienen. Auch ist es fraglich, dass die angewandten Analysebedingungen optimal für diese Hefeart waren. Zur genauen Beurteilung der enzymatischen Aktivität von *K. slooffiae* Spezies sollten deshalb solche Methoden entwickelt und angewandt werden, die entsprechend den Lebensbedingungen dieser Hefespezies optimiert sind.
10. Da sich die *K. slooffiae* im Schweinedarm gut etablieren kann und hohe Konzentrationen erreicht, könnte diese Spezies durch ihre Stoffwechsel- und Enzymaktivitäten die intestinale Mikrobiota bzw. die Gesundheit der Ferkel insbesondere in der kritischen Absetzperiode positiv beeinflussen.

Die Untersuchungen dieser Studie bestätigen die in der Literatur beschriebene Dominanz von *K. slooffiae* im Schweinedarm. In den bisher publizierten Untersuchungen wurden jedoch nur die im GIT vorkommenden Hefen analysiert, ohne dabei das Alter der Tiere, die verabreichte Nahrung oder die Umweltbedingungen zu berücksichtigen. Der Verdauungstrakt der Schweine repräsentiert ein komplexes Ökosystem. Um die Rolle bzw. Funktionen der intestinalen Hefen nachvollziehen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit auch die im Milieu wichtigen bakteriellen Gruppen - Enterobakterien, Enterokokken und Laktobazillen - in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Ergebnisse dieser

Untersuchungen eröffnen ein neues, bisher wenig bekanntes Feld über die qualitative und quantitative Entwicklung der Hefen im Darm der Absetzferkel und deren möglichen Einfluss auf die intestinale Mikrobiota. Damit wird der gegenwärtige wissenschaftliche Kenntnisstand erweitert.

Unabhängig davon sind weitere Untersuchungen notwendig, die das Verständnis über die Wirkung von *K. slooffiae* im GIT der Ferkel sowie die Interaktionen mit den intestinalen Bakterien und dem Wirtsorganismus vervollständigen. Auch erscheint es sinnvoll der Fragestellung nachzugehen, inwieweit eine gezielte Darmbesiedlung der Absetzferkel mit *K. slooffiae* als Probiotikum unter dem Blickwinkel der Erhaltung der Gesundheit der Tiere in dieser kritischen Lebensphase sinnvoll und von praktischem Wert sein kann.